

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



* 5 3 0 9 5 5 9 6 2 4 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTUDIOS DE INTERACCION ENTRE EL CUARTO
COMPONENTE DEL COMPLEMENTO HUMANO (C4)
E INMUNOAGREGADOS DE IgG**

TESIS DOCTORAL

**ANGEL SANCHEZ RODRIGUEZ
MADRID, 1993**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angel Sanchez Rodriguez', enclosed within a large, loopy circular flourish.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando Vivanco Martinez', written in a cursive style.

DIRECTOR : DR. FERNANDO VIVANCO MARTINEZ

A mis padres.

SUMARIO

I. <u>INTRODUCCION.</u>	2
1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO: ANTECEDENTES HISTORICOS.	2
2. LA CASCADA DEL COMPLEMENTO: UN SISTEMA MULTIPROTEICO CON DOS VIAS DE ACTIVACION Y UNA EFECTORA.	2
2.1. La vía clásica.	3
2.1.1. Iniciación de la cascada: el primer componente del complemento (C1).	4
- C1q.	
- C1r y C1s.	
- <u>iniciación de la vía clásica.</u>	
- <u>regulación.</u>	
2.1.2. La C3 convertasa de la vía clásica.	7
- C2, la subunidad catalítica.	
- <u>formación de la C3 convertasa.</u>	
- activación de C4 por C1s.	
- unión de C4 a superficies receptoras.	
- activación de C2.	
2.1.3. La C5 convertasa de la vía clásica.	9
- C3, el elemento central de las cascadas del complemento.	
- <u>formación de la C5 convertasa.</u>	
2.1.4. Regulación de la vía clásica.	10
- factor I.	
- factor H.	
- C4bp.	
- CR1, el receptor de complemento tipo 1 (CD35).	
- el factor acelerador del decaimiento (DAF).	
- MCP, la proteína cofactora de membrana.	
- la <u>regulación</u> de las convertasas de la vía clásica.	
2.2. La vía alternativa: breve comentario.	13
- factor B, la subunidad catalítica.	
- factor D.	
- <u>la cascada de la vía alternativa.</u>	
- la properdina.	
2.3. El complejo de ataque a membrana (MAC).	15
- C5, el iniciador del MAC.	
- los componentes finales de la cascada.	
- <u>el proceso de formación del poro.</u>	
3. FUNCIONALIDAD BIOLOGICA DE LOS COMPONENTES DE LA VIA CLASICA.	17
3.1. En la inflamación.	17
3.2. Aclaramiento de inmunocomplejos.	18
3.2.1. La inhibición de la inmunoprecipitación (IIP).	18
3.2.2. La solubilización de inmunocomplejos (SOL).	
3.2.3. Eliminación de inmunocomplejos del torrente sanguíneo.	20
3.3. Lisis celular.	20
3.4. Función inmunológica.	21

4. EL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C4).	22
4.1. Los genes de C4 en la región de clase III del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).	22
4.2. Estructura del cuarto componente del complemento.	24
4.3. Biosíntesis y secreción.	27
4.4. El enlace tioéster: clave funcional. El proceso autocatalítico.	29
4.5. Los determinantes antigénicos Chido y Rodgers.	31
4.6. C4a: la tercera anafilotoxina.	33
4.7. Diferencias entre los isotipos C4A y C4B.	34
4.8. Polimorfismo de C4 en el hombre.	36
4.9. Aspectos evolutivos: el cuarto componente del complemento en ratón.	38
4.10. Patología asociada a las deficiencias alélicas de C4.	40
5. LAS INMUNOGLOBULINAS DE CONEJO.	41
5.1. Digestiones enzimáticas.	42
6. INTERACCION COVALENTE ENTRE C4 Y SUPERFICIES RECEPTORAS: EL ESTADO DE LA CUESTION.	43
II. <u>OBJETIVOS.</u>	45
III. <u>MATERIALES Y METODOS.</u>	47
1. MATERIALES.	47
1.1. Plasma humano.	47
1.2. Eritrocitos de carnero.	47
1.3. Hemolisina de conejo.	47
2. AISLAMIENTO DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.	48
2.1. Aislamiento del primer componente del complemento (C1).	48
2.2. Aislamiento del cuarto componente del complemento (C4).	49
2.2.1. Método de Lundwall et al.	49
2.2.2. Repurificación de C4 por FPLC.	50
2.2.3. Por inmunoabsorbente policlonal.	50
- inmunización y purificación de la fracción y de la IgG anti-C4 de conejo.	
- acoplamiento a Sepharosa 4B activada con CNBr.	
- aislamiento de C4AB (C4A3 o C4B1 a partir de plasma monoisotípico).	
2.2.4. Por inmunoabsorbente monoclonal L003 (aislamiento de isotipos).	51
- aislamiento de IgG1 a partir de ascitis de ratón.	
- acoplamiento a Sepharosa 4B activada con CNBr.	
- aislamiento de los isotipos de C4.	
3. FORMACION DE INMUNOCOMPLEJOS OVOALBUMINA (OVA)-ANTIOVOALBUMINA.	53
3.1. Obtención del suero antiovoalbúmina: pauta de inmunización.	53
3.2. Purificación de la fracción y y obtención de IgG anti-OVA.	53

3.3. Formación de inmunocomplejos. Curva de precipitinas.	53
4. MARCAJE RADIOQUIMICO DE LA IgG CON ^{125}I .	54
5. ENSAYOS DE INTERACCION ENTRE C1, C4 E INMUNOCOMPLEJOS OVA-ANTIOVA.	55
6. METODOS DE DETECCION Y CUANTIFICACION.	55
6.1. Ensayo hemolítico: breve introducción teórica.	55
6.1.1. Preparación de eritrocitos de carnero sensibilizados.	56
6.1.2. Ensayo hemolítico de las fracciones cromatográficas.	57
6.1.3. Determinación del número de moléculas activas de C4.	57
6.2. Inmunodifusión doble radial.	58
6.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y detección radiográfica.	
6.3.1. Método de Laemmli.	58
6.3.2. Método de Roos.	60
6.3.3. Electroforesis bidimensionales: tratamiento con hidroxilamina.	60
6.3.4. Elución de los complejos de los geles de poliacrilamida.	61
6.3.5. Densitometrados.	61
6.3.6. Fluorografía.	61
6.4. Espectroscopía de absorción.	62
7. MARCAJE DE C4 CON IODO[1- ^{14}C]ACETAMIDA.	62
8. DIGESTIONES ENZIMATICAS.	63
8.1. Digestiones pepsínicas.	63
8.1.1. De los complejos de interacción.	63
8.1.2. De C4 marcado con iodo[1- ^{14}C]acetamida.	63
8.2. Digestiones tripsínicas.	63
9. FRACCIONAMIENTO DE PEPTIDOS.	63
9.1. Filtración en gel en Biogel P4.	63
9.2. Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	64
9.2.1. De los péptidos de C4 marcados con iodo[1- ^{14}C]acetamida.	64
9.2.2. Filtración en gel por FPLC (Cromatografía líquida de alta velocidad para proteínas).	65
10. SECUENCIA RADIOQUIMICA.	65
11. INMUNOBLOTTING.	65
11.1. Trasferencia a membranas.	65
11.2. Revelado con anticuerpo anti-Fc unido a peroxidasa.	66
12. INMUNOPRECIPITACION.	66

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.	68
1. AISLAMIENTO DEL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C4).	68
1.1. Aislamiento de C4AB.	68
- método de Lundwall et al.	
- repurificación por FPLC.	
- por inmunoabsorbente policlonal.	
1.2. Aislamiento de C4A3.	72
1.3. Aislamiento de isotipos.	73
2. CONSUMO DE C4 DURANTE LA ACTIVACION DE LA VIA CLASICA DEL COMPLEMENTO.	74
3. DETECCION Y CARACTERIZACION DE COMPLEJOS COVALENTES FORMADOS DURANTE LA ACTIVACION DE LA VIA CLASICA ENTRE C4 E INMUNOCOMPLEJOS OVA-ANTIOVA.	78
3.1. Implicación de C4 en la interacción.	78
3.2. Implicación de la IgG en la interacción.	79
3.3. Determinación del peso molecular de los complejos.	80
3.4. La cadena α' de C4 forma parte del complejo de interacción.	81
3.5. Cálculo del porcentaje de moléculas de C4 que forman complejos C4b-IgG.	84
4. C4A Y C4B: DOS MOLECULAS CON ALTA HOMOLOGIA Y REACTIVIDADES DIFERENTES.	86
4.1. Determinación del número de moléculas activas de los isotipos de C4.	86
4.2. Los isotipos de C4 forman complejos electroforéticamente diferenciables.	88
4.2.1. Geles de acrilamida de bajo reticulado permiten la diferenciación de los complejos formados con C4A de los de C4B.	88
4.2.2. La banda A de los geles de Laemmli es el origen de los dobletes en los geles de bajo reticulado (Roos).	91
5. CONFIRMACION DE LOS COMPLEJOS α'-L.	92
6. DETECCION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS COVALENTES ENTRE α' DE C4b Y EL DOMINIO Cy3 DE LA IgG.	95
6.1. Implicación de un fragmento de 2.5 Kd de la cadena α' de C4b.	95
6.1.1. Digestión pepsínica de los complejos.	95
6.1.2. Digestión pepsínica de C4: cinética.	96
6.1.3. Electroforesis bidimensional de los complejos de interacción formados con C4B y digeridos con pepsina.	97
6.1.4. Caracterización y purificación de un péptido radiactivo de 2.5 Kd en iodo[1- 14 C]acetamida-C4 digerido con pepsina.	99
6.2. Implicación del dominio Cy3 de la IgG.	101
6.2.1. Purificación y secuencia radioquímica del péptido liberado por hidroxilamina de los complejos formados en el precipitado y el sobrenadante de las digestiones pepsínicas de los complejos iodo[1- 14 C]acetamida-C4Bb-IgG.	101
6.2.2. Immunoblotting de los digeridos pepsínicos con suero anti-Fc.	104
6.2.3. Inmunoprecipitación con suero anti-Fc.	105

6.2.4. Filtración en gel de los sobrenadantes de la digestión pepsínica de los complejos de interacción iodo[1- ¹⁴ C]acetamida-C4Bb-IgG.	105
7. COMPLEJOS DE INTERACCION CON OTRAS ZONAS DE LA IgG.	106
7.1. Estudios previos de unión de C4b al dominio Cy2.	106
7.2. Unión a la región Fd.	107
V. <u>CONSIDERACIONES FINALES.</u>	111
VI. <u>CONCLUSIONES.</u>	118
VII. <u>BIBLIOGRAFIA.</u>	120

Abreviaturas

A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
A ₄₁₄	Absorbancia a 414 nm
AC	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Complemento
DEAE	Dietilaminoetilo
CVF	Factor de veneno de cobra
Dip-F	Diisopropilfluorofosfato
DNP-Lys	Dinitrofenil-lisina
E/S	Relación enzima/sustrato
EA	Eritrocitos sensibilizados
EDTA	Acido etilendiamino tetracético, sal disódica
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas de alta resolución
GVB ²⁺	Tampón barbital sódico 4.94 mM pH 7.35 conteniendo 142 mM en NaCl, 0.1 % de gelatina, 0.3 mM de CaCl ₂ y 1 mM de MgCl ₂ .
Kd	Kilodaltons
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSA	Albúmina de suero humano
IC	Inmunocomplejos
IIP	Inhibición de la inmunoprecipitación
LES	Lupus eritematoso sistémico
LHRs	Secuencias repetitivas homólogas largas
mA	Miliamperios
mS	Milisiemens
OVA	Ovoalbúmina
PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y en presencia de SDS
PBS	Tampón fosfato sódico 0.01 M pH 7.2 conteniendo 0.15 M de NaCl
P.I.	Parcialmente inhibitorio
QAE	Dietil-(2-hidroxipropil)aminoetilo
RCA	Reguladores de la acción del complemento
SCRs	Regiones repetitivas consenso
SOL	Solubilización
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
TFA	Acido trifluoroacético
Tween 20	Monolaurato de polioxietileno sorbitan
UV	Ultravioleta
V _E	Volumen de elución
V ₀	Volumen de exclusión
V _T	Volumen total
VA	Vía alternativa
VC	Vía clásica

Ha llegado el momento de pedir perdón a aquellas personas que por una u otra causa se hayan sentido heridas durante mi estancia en el departamento, así como de perdonar a aquellos, pocos en realidad que han hecho que nuestro trabajo, duro por sí mismo, se convirtiera, a veces, en un verdadero calvario.

Escribir en cuatro líneas mis sentimientos de gratitud sería prácticamente imposible y creo que no es el motivo de una tesis doctoral. Mis complacencias a todos los que de una u otra forma sientan en el interior de su corazón que han cooperado tanto en el plano intelectual como a nivel humano durante los siete largos años que ha durado este trabajo.

Es imprescindible destacar al Dr. Fernando Vivanco, el director de esta tesis, por el esfuerzo que ha supuesto sacar adelante un proyecto tan poco gratificante. En estos momentos no es posible olvidar a Chema, con quien tuve la satisfacción de iniciar mi andadura en la investigación y que me enseñó casi todo lo que sé en esta aventura del complemento.

A todos los donantes de sangre, sintetizados en Ignacio Díaz y Francisco Bermúdez, mi sincero aprecio y veneración, pues sin ellos no habría sido posible ni siquiera plantearse la investigación. También una reseña al equipo de fotografía de la Fundación Jiménez Díaz, que han tenido que soportar unos geles nada fáciles de plasmar en una película fotográfica.

Casi para terminar, y para que no me pegue, es necesario hacer sobresalir entre todos mis compañeros de trabajo, Pilar, Luis, Guillermo, Elena, Ester, a Maite. Posiblemente sin su cooperación, este trabajo todavía no se habría escrito.

Por último, un abrazo muy fuerte para todos los amigos que han sabido soportarme en los momentos de desesperación y animarme para que el trabajo este concluído.

I.INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

1. EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO: ANTECEDENTES HISTORICOS.

El inicio de los estudios sobre el sistema del complemento se remonta al año 1888 cuando Nutall observó que la actividad bactericida de la sangre desfibrinada de carnero se eliminaba por calentamiento a 55°C o manteniéndola durante un tiempo prolongado a temperatura ambiente^[1]. Un año más tarde, Buchner llama "alexina" a una proteína cuya actividad se pierde por diálisis de suero fresco frente a agua a 0°C durante 18-36 horas, pero que se mantiene si se realiza frente a tampón bicarbonato conteniendo 0.75-0.8 % de NaCl. Un nuevo avance en el conocimiento llegó de la mano de Pfeiffer e Issaef (1894) quienes asimilan la "alexina" a la combinación de anticuerpos específicos con otros factores séricos.

Sin embargo, no es hasta la llegada de Bordet (1894), considerado el descubridor del complemento, cuando se impulsa su estudio. Utilizando suero inactivado por calor, observa que pequeñas cantidades de suero fresco no inmune restituyen la actividad lítica. De estos experimentos deduce la necesidad de dos sustancias para ejercer dicha acción: una termoestable en sueros inmunes (el anticuerpo) y otra termolábil, capaz de lisar eritrocitos sensibilizados con anticuerpos específicos frente a antígenos eritrocitarios, que rápidamente asimila al componente "alexina".

Posteriormente, en 1899, Ehrlich define el concepto de amboceptor para la fracción termoestable y el de "COMPLEMENTO" para el componente "alexina"^[2].

2. LA CASCADA DEL COMPLEMENTO: UN SISTEMA MULTIPROTEICO CON DOS VIAS DE ACTIVACION Y UNA EFECTORA.

En 1907, Ferrata, separa del suero por medios fisicoquímicos (diálisis frente a agua y pH ácido) una fracción precipitable (euglobulinas) y un sobrenadante (pseudoglobulinas), ambos carentes de actividad por separado.

El carácter secuencial del complemento tiene su origen en Braud, quien llamó "midpiece" (C'1) a la fracción precipitable que actuaba después que el anticuerpo se hubiera unido al eritrocito, y "endpiece" (C'2) al sobrenadante. Ritz (1912) y Coca (1914) demostraron la existencia de un tercer componente (C'3). Más tarde, en 1926, Gordon descubre que el amonio destruye un factor termoestable distinto de C'3. Nace C'4. El orden de actuación (C'1-C'4-C'2-C'3), así como la separación de las cuatro fracciones, fue determinada por Pillemer en 1941^[1]. En este estado de conocimiento hubo que esperar hasta el año 1966 en el que Nelson demuestra que C'3 está compuesto de 6 subcomponentes (C3, C5, C6, C7, C8 y C9).

Durante el periodo anterior a 1954, se consideró que el sistema del complemento tenía una sola vía de activación dependiente de AC, lo que hoy se conoce como vía clásica (VC). Fue Pillemer quien describió una proteína (properdina), capaz de unirse a bacterias y levaduras en ausencia de AC y activar el complemento. Propuso una nueva vía de activación, la vía de la properdina, hoy llamada vía alternativa (VA). Desgraciadamente, sus colegas no comprendieron los datos expuestos por Pillemer, quien a la vuelta de un congreso en 1957, sufrió una depresión y se suicidó por sobredosis de barbitúricos. Años más tarde, Lepow, de su propio laboratorio, confirmaría los trabajos.

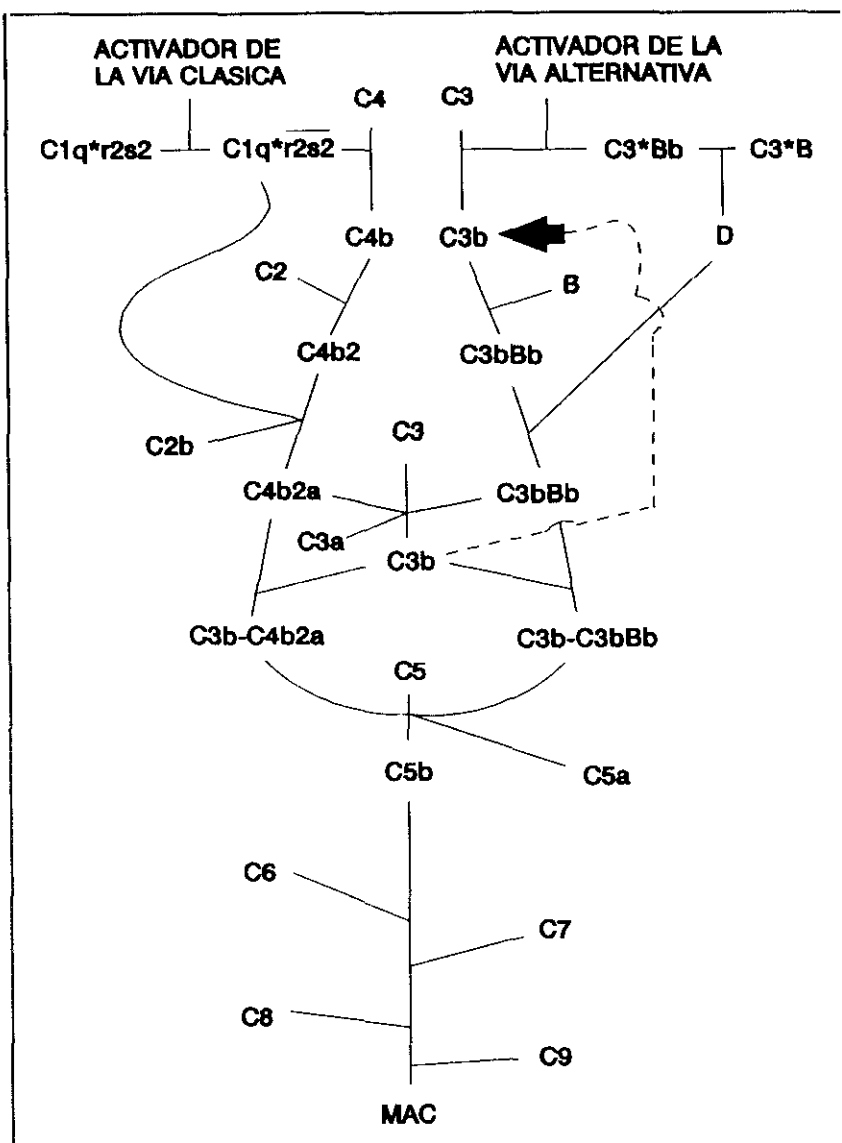


Figura 1.1. El sistema del complemento: esquema general. $C3' = C3(H_2O)$.

Actualmente este sistema en cascada, con dos vías de activación interconectadas y una secuencia efectora lítica (figura 1.1) consta de más de 20 proteínas estructurales, enzimáticas y reguladoras, así como una decena de receptores celulares para ellas y sus fragmentos proteolíticos. Tres mecanismos distintos están envueltos en su iniciación:

- la activación de proenzimas, que implica a la VC.
- un proceso de activación continuada como punto de partida de la VA.
- fenómenos proteolíticos por enzimas exógenas al complemento.

2.1. LA VIA CLASICA.

Las principales características de las proteínas que intervienen en la activación por la VC se muestran en la tabla 1.1.

2.1.1. Iniciación de la cascada: el primer componente del complemento (C1).

C1 es un complejo macromolecular constituido por tres subcomponentes, C1q, C1r y C1s, presentes en el suero humano en proporciones equimoleculares. Forman un complejo de 740 Kd en relación estequiométrica 1:2:2^[3], que requiere iones calcio para su acoplamiento y función.

Tabla 1.1. Características de las proteínas de la vía clásica.

Componentes	Peso molecular (Kd)	Estructura en cadenas	Cromosoma	Concentración sérica (µg/mL)
C1q	459	A:22.6 Kd B:22.6 Kd C:24 Kd	1p 1p 1p	80
C1r	83		12p	34-50
C1s	83		12p	30-50
C2	102		6p	15-20
C3	185	α:110 Kd β:75 Kd	19p	1200-1300
C4	205	α:97 Kd β:75 Kd γ:33 Kd	6p	350-600

C1q, el componente de mayor tamaño, 459 Kd, es codificado en el hombre por el cromosoma 1. Su arquitectura molecular está conformada por 18 cadenas polipeptídicas (6A, 6B y 6C) que se arrollan en espiral, tres a tres, para construir seis hélices triples que en su extremo N-terminal de 81 aminoácidos (el tallo colagénico responsable de la unión a su receptor) presentan la típica estructura Gly-X-Y con abundancia relativa de hidroxiprolina e hidroxilisina. Las hélices, unidas por puentes disulfuro intrahelicoidales (A-B) y extrahelicoidales (C-C), marchan paralelas hasta la mitad de su longitud, para más tarde divergir con un ángulo de unos 45°, originado por rotura en la secuencia característica del tallo colagénico (una Ala en vez de la correspondiente Gly en C36, y una Thr extra en medio de dos secuencias Gly-X-Y en la posición A39). En el extremo C-terminal, las estructuras helicoidales se desenrollan para constituir seis cabezas globulares no colagénicas de 136 aminoácidos. El conjunto, visto por microscopía electrónica, adopta una forma de tulipán^[4] (figura

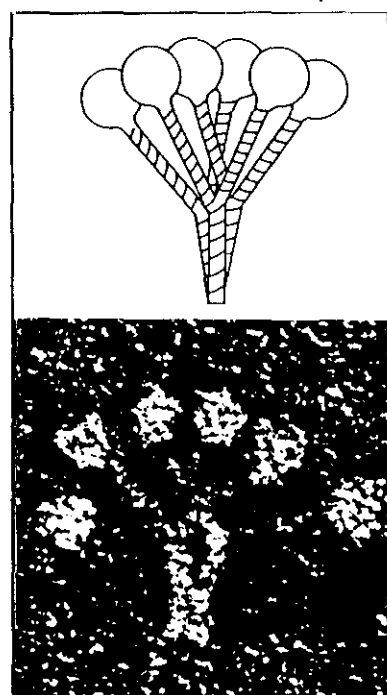


Figura 1.2. C1q. A. Estructura⁵. B. Microscopía electrónica⁴.

1.2). La molécula está glicosilada en seis Asn de las cabezas globulares, y en algunas hidroxilisinas de la región colagénica^[5].

Los otros subcomponentes, **C1r** y **C1s**, de 83 Kd, son serinproteasas glicosiladas de alta homología constituidas por dos dominios globulares conectados por una estructura elongada. El menor de ellos (B), de 27 Kd, alberga el sitio catalítico con el característico triplete His, Asp y Ser. Sus cadenas pesadas de 56 Kd, no catalíticas (A), se localizan en el extremo N-terminal y poseen un subdominio rico en cisteínas, semejante al del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y dos pares distintos de regiones consenso repetitivas (SCRs) de unos 60 aminoácidos que mantienen varios residuos conservados, especialmente cuatro cisteínas. El primer grupo de SCRs está envuelto en la especificidad enzimática (subdominios I y III, no presentes en otras serinproteasas); el dominio EGF (II) parece implicado en la autoasociación de ambas moléculas para formar un tetrámero dependiente de Ca^{2+} , C1r2s2; el segundo par de SCRs, situadas en el C-terminal del dominio A, son semejantes a las existentes en las proteínas que unen C3b/C4b (subdominios IV y V). La cadena A presenta dos sitios de glicosilación (subdominios III y IV) y se une a B por puentes disulfuro^[6]. Los genes de ambas proteínas se encuentran ligados dentro de un corto segmento cromosómico en la región p13 del cromosoma 12 humano^[7].

La vía clásica se inicia por el reconocimiento, unión y posterior activación de C1q por inmunocomplejos o agregados de IgG e IgM, aunque también puede efectuarse por polianiones, como polisacáridos bacterianos, ADN, ARN, etc.. C1q se fija débilmente a través de sus cabezas globulares a la región Fc de la IgG en estado monomérico, incrementándose la fuerza de unión cuando ésta forma parte de inmunocomplejos. Experimentalmente se han detectado variaciones relacionadas con la capacidad de los diferentes isotipos de IgG para unirse y activar C1q: IgG3 es el isotipo más activo en la unión, IgG1 el más eficaz en la lisis celular por complemento e IgG4 apenas se une^[8]. Estas diferencias se deben a una mayor longitud de la región bisagra en IgG3, que permitiría una mejor accesibilidad de las cabezas globulares al dominio Cy2, facilitando la unión, pero distanciando la zona de activación de la superficie aceptora, lo que causaría una reducción en la interacción al incrementarse la posibilidad de inactivación de C4b por una molécula de agua. A pesar de esto, la longitud de la región bisagra no es suficiente para activar complemento: al diseñar AC quiméricos IgG3 con la región bisagra de IgG4 se reduce la pegada de C1q, y por el contrario, cuando se diseñan IgG4 con la región bisagra de IgG3, no se activa complemento^[9].

Los residuos del Cy2 implicados en la interacción con C1q son el Glu³¹⁸, la Lys³²⁰ y la Lys³²². El primero formando puentes de hidrógeno, y las últimas, mediante interacciones electrostáticas^[10]. Recientemente, en un trabajo publicado por nosotros, se demuestra que los residuos A162, B163 y C156 de las cabezas globulares de C1q, parecen ser los responsables de la unión a la IgG^[11].

La unión de C1 a ICs, y su posterior activación, se ve afectada por la proporción

AC/Ag y el tamaño de los agregados. Es más eficaz a concentraciones altas del primero y con complejos de elevado tamaño, aunque la relación AC/Ag es dependiente del antígeno que se encuentre en la red^[12, 13].

Se han demostrado sistemas de activación poco frecuentes. Saint-Remy, J.M.R. ha publicado un anticuerpo monoclonal IgE capaz de activar la VC, pero de forma mucho más débil que la IgG^[14].

También, se ha detectado la formación de una C3-convertasa de la VC sin la intervención de C1 en eritrocitos revestidos de LPS en presencia de factores Ra (factores bactericidas dependientes de complemento) que presentan una secuencia parecida a C1q^[15].

Ensamblaje de C1. La interacción de al menos dos cabezas globulares de C1q con la molécula activadora permite el acoplamiento del complejo C1r2s2 dependiente de calcio y la autoactivación de la proenzima C1r cuyo mecanismo es desconocido. Este complejo tetramolecular se sitúa en el cono de C1q e interacciona débilmente con el dominio Cy3 de la IgG^[16].

Ambas moléculas, C1r y C1s, se asocian por sus subunidades pequeñas, de tal modo que sus dominios catalíticos queden próximos favoreciéndose la activación de C1s mediante la rotura del enlace peptídico entre la Arg⁴²² y la Ile⁴²³.

Experimentos de dispersión de neutrones especulan con la posibilidad de que la rotura de C4 mediada por C1 implique la interacción de C4c con los dominios SCRs de C1s y desde allí se produzca la escisión molecular con la liberación de C4a. Solamente los modelos en W

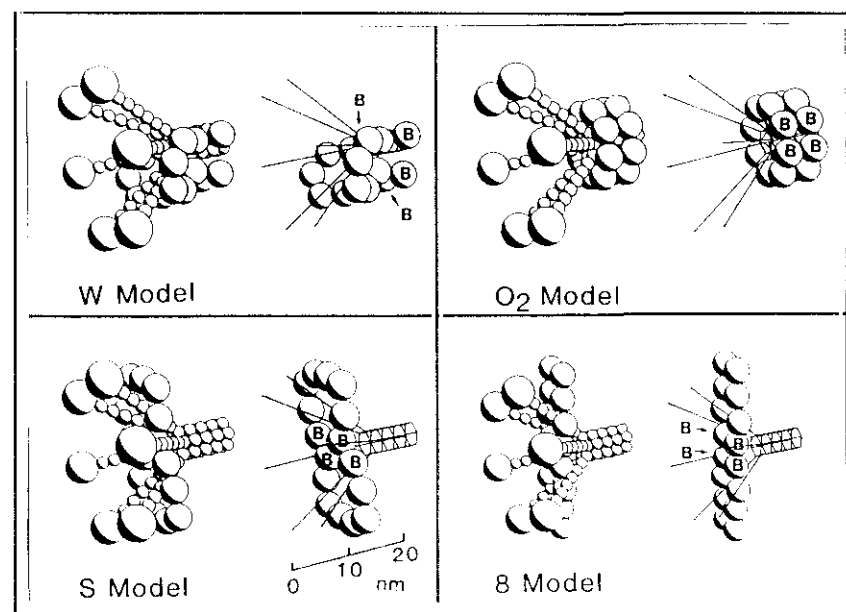


Figura 1.3. Modelos moleculares de C1.

y O del acoplamiento de C1r2s2 a C1q serían compatibles con esta hipótesis^[17]. A pesar de estos estudios predictivos, el modelo más aceptado actualmente es el de Schumaker et al.^[18], basado en los datos de microscopía electrónica, en el que C1r se inserta dentro del tulipán, mientras cada molécula de C1s gira y encierra un brazo de C1q (figura 1.3).

La regulación en este paso de iniciación se lleva a cabo, principalmente, por C1-inhibidor (C1-Inh), una α 2-neuraminoglicoproteína altamente glicosilada de 105 Kd perteneciente a la familia de las serpinas. Se sintetiza principalmente en hígado y en monocitos, encontrándose, también, en el interior de los gránulos α de las plaquetas. Su concentración plasmática es de 15-35 mg/100 mL.

C1-Inh interacciona reversiblemente con C1 inactivado, previniendo la activación espontánea de C1r. Cuando ICs se hallan presentes en el medio, la unión de 2 ó más cabezas globulares de C1q provoca un cambio conformacional y la liberación del inhibidor, permitiéndose la fijación de C1r2s2. Existe un segundo mecanismo regulador: una vez activado C1, rápidamente se forma un complejo covalente entre C1-Inh y el tetrámero catalítico con la liberación del complejo C1-Inh--C1r--C1s--C1-Inh^[19] lo que previene la sobreactivación de la cascada del complemento y deja libre las regiones colagénicas para que C1q interaccione con su receptor induciendo gran número de respuestas inmunológicas. Su acción reguladora es menos eficaz cuando C1 se encuentra unido a superficies celulares, posiblemente por una menor accesibilidad de la molécula. C1-Inh regula también otras proteínas plasmáticas (plasmina, kalicreína,...). La deficiencia congénita en esta proteína ocasiona el edema angioneurótico hereditario, un trastorno vascular que se hereda de modo autosómico dominante.

Existen mecanismos de retroalimentación negativa: fragmentos de activación de C3 y C4 (C3b y C4b nacientes) inhiben la activación de C1^[20].

En los últimos años se ha descrito un nuevo inhibidor para C1, factor J^[21], cuya estructura y modo de actuación permanecen en estudio.

2.1.2. La C3-convertasa de la vía clásica.

C2, la subunidad catalítica de las convertasas de la VC, de 110 Kd, es codificada en el cromosoma 6 humano dentro de la región de clase III del complejo mayor de histocompatibilidad^[22] por un fragmento cromosómico de 18 Kb, íntimamente ligado al gen de factor B. Se incluye, al igual que C1r, C1s, factor B, factor D, factor I y otras enzimas no pertenecientes al sistema del complemento, como tripsina y quimotripsina, en la familia de las serinproteasas, por compartir los residuos característicos que constituyen el relé de carga típico de los miembros de este grupo (His-57, Asp-102 y Ser-195 en la numeración de la quimotripsina), lo que permite especular con la existencia de un gen ancestral común. Tanto C2 como factor B presentan su especificidad (reconocimiento y unión del sustrato) en la zona N-terminal (C2b, Ba) que difiere ampliamente del resto de la serinproteasas. Su centro activo se localiza en el fragmento C2a, generado tras la rotura proteolítica de la molécula por C1s.

La **formación de la C3-convertasa** es un proceso secuencial donde se distinguen varias etapas (figura 1.4):

a) la activación de C4 por C1s: Se especula con que la unión de C4 a C1 se realiza a través de un fragmento de 26 Kd (subdominios IV y V) en las ocho SCRs localizadas en las cadenas pesadas del tetrámero^[23]. C1s escinde el enlace peptídico Arg⁷⁷-Ala⁷⁸ en la cadena α de C4, liberando un pequeño péptido de 9 Kd^[24], C4a, con función anafilotóxica, y C4b, compuesto por α' (resto C-terminal de la cadena α) unida por puentes disulfuro a las cadenas β y γ , con la aparición de un grupo carbonilo reactivo procedente de la rotura del tioéster interno oculto en la molécula nativa. Esta rotura determina un cambio conformacional, detectado por dicroísmo circular: una alteración en el ambiente de los cromóforos (UV próximo) y pequeños cambios en el esqueleto proteico (UV lejano), perceptibles también en C4 inactivado por una molécula de agua (C4H₂O)^[25].

Algunos estudios^[26] demuestran la activación de C4 por enzimas no pertenecientes al sistema del complemento (tripsina, elastasa, quimotripsina, enzimas bacterianas,...). La molécula resultante tiene actividad hemolítica y en algunos casos (tripsina y enzimas bacterianas) es capaz de formar una C3-convertasa funcional, pero menos eficaz que la generada por C1s. Un mecanismo semejante puede implicarse como iniciador de la VA (ver el apartado 2.2).

b) unión de C4 a las superficies receptoras: el fragmento C4b adquiere la capacidad de unirse covalentemente a ICs u otras superficiesceptoras formando

enlaces amida o éster por un proceso de transacilación a través del grupo carbonilo liberado del tioéster. Estas interacciones se verán con más detalle en los apartados 4.4 y 6.

c) activación de C2: C2, el subcomponente catalítico, se une a C4b de forma no covalente por su dominio N-terminal de un modo dependiente de Mg²⁺^[27] (También es capaz de unirse a C4 inactivado por CH₃NH₂)^[28, 29]. Si la unión ocurre en las cercanías de C1s, C2 se fragmenta en un grupo N-terminal no catalítico de 34 Kd (C2b) y una subunidad catalítica C-terminal de 77 Kd (C2a). La presencia de C4b favorece la acción proteolítica de C1s sobre

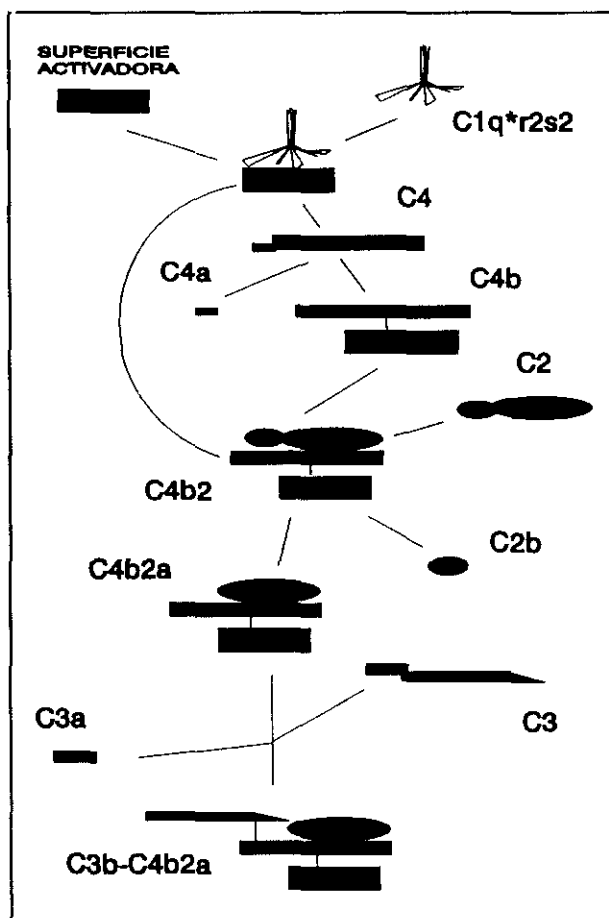


Figura 1.4. Esquema de activación de la vía clásica.

C2^[30, 31]. C4b presenta dos sitios de baja afinidad para C2, uno para C2b y otro para C2a, con el Mg^{2+} como efector alostérico del último. Al producirse la rotura de C2 por C1s se genera el sitio de alta afinidad para C2a^[32], permaneciendo los fragmentos de C2 unidos por fuerzas no covalentes a C4b^[33]. La enzima así formada, C4b2a^[34], es la C3-convertasa de la VC, capaz de hidrolizar C3 liberando un fragmento de 77 aminoácidos con función anafilotóxica (C3a) y provocar en el resto de la molécula, C3b, un cambio conformacional con la exposición al solvente de un grupo carbonilo reactivo procedente del tioéster interno que se encontraba oculto en la molécula nativa.

Smith et al.^[35] han publicado los modelos en microscopía electrónica de las C3 convertasas y de algunos de sus componentes.

2.1.3. La C-5 convertasa de la vía clásica.

C3, el elemento central de las cascadas del complemento, es una glicoproteína de 185 Kd mayoritaria en plasma con una concentración de 1.2-1.3 mg/mL. Al igual que C4 y C5, se sintetiza como un precursor monocatenario, que después de la eliminación del péptido señal y la adición de azúcares, sufre un procesamiento proteolítico convirtiéndose en una molécula bicatenaria con sus dos cadenas, α de 110 Kd y β de 75 Kd, enlazadas por puentes disulfuro. Es codificada en el cromosoma 19 humano indicando que el proceso de divergencia evolutiva respecto a C4 ha sido temprano, a pesar de que ambas conservan el tioéster interno. Su polimorfismo genético, menor que el de C4, presenta dos variantes electroforéticas comunes, F y S.

Formación de la C5-convertasa: La molécula de C3b generada por acción catalítica de la C3-convertasa puede seguir varios caminos:

1. Inactivarse por la captación de una molécula de agua en los grupos carbonilo y sulfidrido liberados del tioéster.
2. Unir mediante enlaces covalentes, preferentemente tipo éster, el carbonilo reactivo a grupos OH de la superficie aceptora.
3. Formar un enlace éster con la cadena α' de C4b presente en la C3-convertasa generando un sitio de alta afinidad para C5^[36] que cambia la especificidad enzimática y transforma el complejo en la C5-convertasa de la VC (C3b-C4b2a). Kim et al.^[37] presentan evidencia de que el enlace entre C3b y C4b ocurre en la Ser¹²¹⁷ de C4 humano (Ser¹²¹³ en ratón). Por otro lado, demuestran que los mutantes de C4b que son incapaces de unir covalentemente C3b, pueden formar una C5-convertasa activa, indicando que la unión covalente no es un requisito estricto para la construcción de la nueva enzima.

Experimentalmente se ha conseguido la activación proteolítica de C5 en ausencia de C3^[38], lo que estaría relacionado con los trabajos de Masaki et al.^[39] que refieren la formación de una C5-convertasa con dímeros de C4b sobre liposomas.

2.1.4. Regulación de la vía clásica.

Para el desarrollo de una actividad fisiológica normal, y con el fin de evitar reacciones perjudiciales de los propios mecanismos defensivos del organismo, se hace indispensable la existencia de factores reguladores. En un sistema tan complejo como el complemento, el número de proteínas reguladoras (tabla 1.2) y sus mecanismos de acción son múltiples. Ahora pasaremos brevemente a su descripción.

Factor I es una serinproteasa resistente a Dip-F que se sintetiza en monocitos como un precursor monocatenario de 88 Kd posteriormente procesado a la forma plasmática^[40] constituida por 20 SCR's localizadas en dos cadenas polipeptídicas (46 y 39 Kd) unidas por puentes disulfuro. Su cadena pesada presenta un dominio rico en cisteínas como ocurre en los receptores de lipoproteínas de baja densidad. Circula en plasma en su forma activada.

Factor H es una glicoproteína de 150 Kd cofactora de factor I en la rotura de C3b.

Tabla 1.2. Características de las proteínas reguladoras.

Componentes	Peso molecular (Kd)	Estructura en cadenas	Cromosoma	Concentración sérica (µg/mL)	Especificidad
C1-Inh	110		11q	150-350	C1r, C1s
Factor H	150		1q	480	C3b
Factor I	88	46 39	4	35	C3b,C4b
C4bp	500	7a:70 1B:45	1q	250	C4b
CR1	160-250		1q	-	C3b,C4b
DAF ^a	70		1q	-	C4b2a C3bBb
MCP ^b	45-70		1q	-	C3b,C4b
Factor J	5.9		-	-	-
IA ^c	310		-	35	C3a,C4a,C5a
Proteína S	80		-	500	C5b-7
HRF ^d	65		-	-	C8,C9
CD59	20		-	-	C8,C9

DAF^a: Factor acelerador del decaimiento; MCP^b: Proteína cofactora de membrana; IA^c: Inactivador de anafilotoxinas; HRF^d: Factor de restricción homólogo.

C4bp es una proteína de 500 Kd, cofactor de factor I en la degradación proteolítica de C4b y favorecedora del decaimiento de la C3-convertasa de la VC. Al microscopio electrónico presenta una forma de araña, con 7 largas cadenas (70 Kd) idénticas y flexibles de 3 x 33 nm unidas a un cuerpo central de 45 Kd^[41] (figura 1.5). Cada uno de los brazos está compuesto en sus 491 aminoácidos N-terminales, de 8 SCRs adoptando una estructura en lámina β y disposición no ordenada. La región C-terminal, más interior, consta de 58 residuos en α -hélice. Por su conformación estructural es capaz de unirse a varias moléculas de C4b simultáneamente^[42].

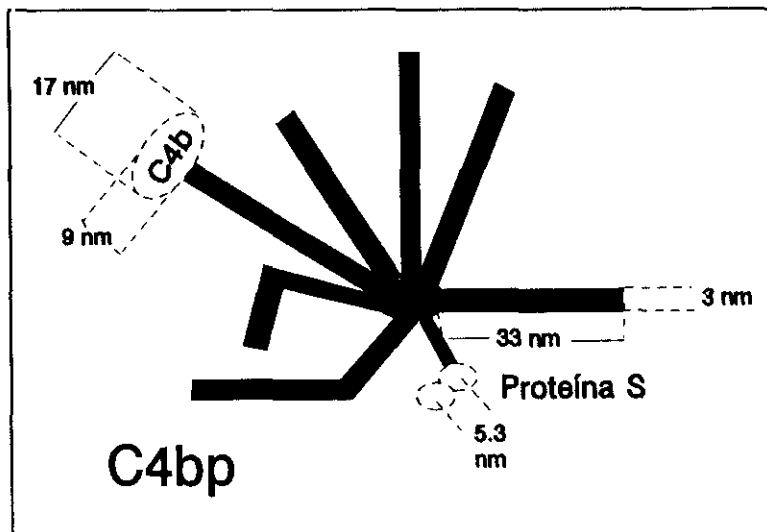


Figura 1.5. Esquema de la estructura de C4bp.

Junto a factor H, CR1, CR2, MCP y DAF es codificada en el brazo largo del cromosoma 1 humano, constituyendo un grupo de ligamiento bautizado como RCA (reguladores de la activación del complemento)^[43].

CR1, el receptor de complemento de tipo 1 (CD35) es una proteína de membrana de 190 Kd, localizada en gran cantidad de tipos celulares (células B, neutrófilos, monocitos, .), pero mayoritaria en eritrocitos, que reconoce C3b, C3(H₂O) y C4b. Su arquitectura molecular está construída por 30 SCRs, de las que 28 se agrupan en 7 series llamadas secuencias repetitivas homólogas largas (LHRs)^[44]. Presenta un polimorfismo inusual relacionado con el tamaño molecular de su dominio extracelular: el alotipo CR1-A, el más frecuente, presenta 30 SCRs, mientras que CR1-B, CR1-C y CR1-D tienen 35, 21 y 42 SCRs, respectivamente. Esta variación parece no afectar a la funcionalidad del receptor, que actúa como cofactor de factor I en la degradación proteolítica de C4b y acelera el decaimiento de la C3-convertasa. Se ha detectado, también, un polimorfismo tisular: en polimorfonucleares, CR1, es 5 Kd mayor que en eritrocitos.

El factor acelerador del decaimiento (DAF) es una glicoproteína de 70-80 Kd^[45] altamente glicosilada por enlaces O-glucosídicos, localizada en un ancho rango de tipos celulares. Su peculiaridad es que se ancla a la membrana plasmática por un glucolípido, el fosfatidil-inositol.

La proteína cofactora de membrana, MCP (CD46) es una molécula reguladora de amplia distribución tisular, inversa a la de CR1, pues no se encuentra en eritrocitos. Esto sugiere que durante la maduración de la línea eritroblástica, CD46 podría ser sustituida por

CR1. Carece de actividad desaceleradora y actúa como cofactor de factor I, siendo capaz de unir C3b, C3(H₂O) y C4b.

La regulación de las convertasas de la vía clásica, vital para la supervivencia del organismo, se lleva a cabo por diferentes mecanismos:

- la alta reactividad del grupo carbonilo, liberado del tioéster tras activarse C4 por C1s o C3 por la C3-convertasa, le lleva a unirse a una molécula de agua si la superficie aceptora no se encuentra próxima, inactivándose e impidiendo la subsiguiente formación de las convertasas.

- la unión de C4bp a C4b, dificultada por C2b^[46], provoca el desplazamiento de C2a y el decaimiento de la C3-convertasa^[25, 47]. En la desestabilización de estas enzimas aparecen implicados, también, factor I, CR1 y DAF. Este último con capacidad para unir C2a o Bb. Nagasawa et al.^[48] han demostrado un decaimiento de la convertasa dependiente de la temperatura (la vida media es de 60 min a 37°C) en ausencia de C4bp, sugiriendo que la disociación es acelerada por C2b, que actuaría como inhibidor "feed-back" de la activación de la VC^[49].

- roturas proteolíticas de los pilares estructurales de las convertasas que alteran su arquitectura molecular y las incapacitan para realizar su función. Primero, factor I efectúa una escisión en ausencia de cofactores generando un producto intermediario con un fragmento de cadena α' de 75 Kd, quedando toda la molécula enlazada por puentes disulfuro^[42]. En un segundo tiempo, factor I en presencia de sus cofactores, C4bp^[50] y CR1^[51], produce dos roturas peptídicas en la cadena α' de C4b generando tres fragmentos: uno de 47 Kd, C4d (movilidad electroforética α), se une a la superficie aceptora por enlaces éster o amida a través del grupo carbonilo del tioéster, y otros dos, de 25 y 17 Kd, permanecen unidos por puentes disulfuro a las cadenas β y γ , constituyendo C4c (movilidad β), que se desprende de la superficie de anclaje.

De igual forma factor I, en asociación con CR1 y factor H (compite con C5 por la unión a C3b, acoplándose a la molécula por su N-terminal), rompe la cadena α' de C3 en un solo enlace originando iC3b. Más tarde, una segunda rotura en un enlace Arg-Ser libera un polipéptido de 3Kd, C3f, de función no aclarada todavía, quedando el resto de la molécula constituido por dos fragmentos en la cadena α' , uno de 68 Kd, portador del grupo carbonilo reactivo, y otro de 43 Kd, unidos ambos a la cadena β por puentes disulfuro.

Una nueva escisión proteolítica por factor I (se discute la intervención o no de cofactores) o proteasas del suero, conduce a la liberación de C3c (dos fragmentos de la cadena α de 25 y 43 Kd unidos por puentes disulfuro a la cadena β), manteniéndose C3d,g unido al aceptor. Este fragmento por tripsinización se hidroliza en C3d y C3g.

En sistemas celulares, CR1 es el cofactor de factor I en el procesamiento de C3b/C4b. Dos SCRs en el N-terminal de la región LHR-A del receptor parecen constituir el sitio de unión para C4b, mientras que el de C3b se localiza en el N-terminal de LHR-B y LHR-C. Esta duplicidad le capacita para unir dímeros C4b-C3b^[51] y C3b-C3b^[52].

Tras el tratamiento con aminas o caotrops, C4 se transforma en C4(H₂O). Von Zabern et al.^[53] demostraron que esta molécula es capaz de formar una C3 convertasa en fase fluída sobre la que actúan los factores reguladores al encontrarse expuesto el sitio de unión para C4bp, oculto en la proteína nativa.

Contrariamente a los reguladores, existen factores con capacidad estabilizadora de las C3-convertasas:

- los factores nefríticos^[54] de C3 y C4. Son autoanticuerpos que pueden alterar el procesamiento "in vivo" de inmunocomplejos en pacientes con patología renal. Actúan impidiendo el decaimiento intrínseco y la acción proteolítica de factor I, en presencia de C4bp^[55] o CR1^[56] para la convertasa clásica, o de factor H para la convertasa de la VA.
- la oxidación de C2 por iodo en un grupo tiol de la molécula^[34].
- el Ni²⁺ amplía la vida media de la convertasa hasta 15 horas^[57].

2.2 LA VIA ALTERNATIVA: BREVE COMENTARIO.

Factor B, la subunidad catalítica, es una glicoproteína de 102 Kd, perteneciente a la familia de las serinproteasas, altamente homóloga a C2, codificada por un gen de 6 Kb dentro de la región de clase III del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en el cromosoma 6 humano. Es activada por **factor D**, otra serinproteasa de 23,5 Kd secretada como un precursor de 30 Kd, que escinde la molécula, desprendiendo Ba, de función desconocida, y Bb, la subunidad enzimática de las convertasas de la VA.

Tabla 1.3. Características de las proteínas de la vía alternativa.

Componentes	Peso molecular (Kd)	Cromosoma	Concentración sérica (µg/mL)
C3	185	19p	1200-1300
Factor B	102	6q	210
Factor D	24	-	1-2
Properdina	220	X	20

La cascada de la vía alternativa. La activación se produce, generalmente, de forma independiente de anticuerpo, sobre estructuras moleculares de la célula diana, pero en casos concretos se dispara por ICs. Su desencadenamiento no se conoce con precisión puesto que

carece de un componente iniciador como C1 en la VC, pero se da por seguro que no media ninguna activación proteolítica. C3 en plasma sufre continuamente hidrólisis espontánea del éster interno oculto, transformándose en $C3(H_2O)$, que adquiere la capacidad de unir factor

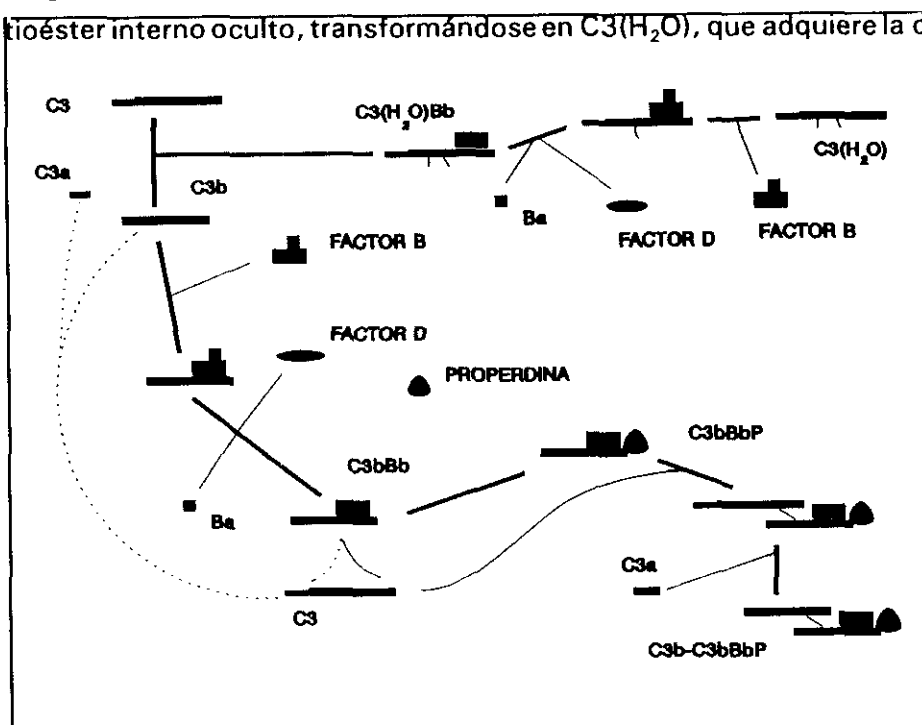


Figura 1.6. Esquema de la activación de la vía alternativa. Línea gruesa: secuencia principal. Línea punteada: ciclo amplificador.

B^[58]. Una vez formado el complejo $C3(H_2O)B$, factor D activa la subunidad catalítica liberando Ba . Se ha construido la C3-convertasa de iniciación dependiente de Mg_{2+} (figura 1.6). La generación de múltiples moléculas de $C3b$, capaces de anclarse a las superficiesceptoras por en l a c e s

preferentemente éster, ejerce el efecto amplificador característico de esta vía^[59].

Otras convertasas de la VA pueden construirse con $C3b$ generadas por la VC o procedentes de la activación proteolítica por enzimas plasmáticas no pertenecientes al sistema del complemento.

El complejo $C3bBb$, cuando no se forma sobre una superficie receptora activante, es disociado por factor H o procesado proteolíticamente por factor I (vease página 11). Las células del huésped presentan en sus membranas proteínas defensivas, CR1, DAF y MCP, con funciones similares a factor H, para protegerse de los mecanismos activadores.

Contrariamente, existe una proteína plasmática con capacidad para incrementar la vida media de las convertasas de la VA retardando el decaimiento de Bb, la **properdina**. Fue la primera molécula descrita en la VA, de ahí que se la refiera, a veces, como vía de la properdina. Es un polímero cíclico mezcla de subunidades de 56 Kd que, por microscopía electrónica, se detecta como trímeros o tetrámeros asociados cabeza-cola.

De forma similar a la C3-convertasa clásica, $C3bBbP$ (C3-convertasa de la VA), hidroliza C3 nativo generando nuevas moléculas de $C3b$ que pueden seguir varios caminos diferentes:

1. Inactivación por una molécula de agua ($C3b(H_2O)$).

1. Inactivación por una molécula de agua (C3b(H₂O)).
2. Unión a la estructura generadora mediante enlaces éster^{60, 61} con cambio de la especificidad enzimática, transformándose en la C5-convertasa de la VA, C3b-C3bBb.
3. Mediante un sistema amplificador, construir C3-convertasas nuevas sobre superficies aceptoras.
4. Fijarse a estructuras no activadoras, donde será procesado por los reguladores.

Activaciones patológicas o experimentales ocurren en fase fluída por agentes estabilizantes de la convertasa como el factor nefrítico de C3, un autoanticuerpo presente en enfermos con ciertas patologías renales, o el factor del veneno de cobra (CVF), que resiste la proteólisis por factor I.

2.3 EL COMPLEJO DE ATAQUE A MEMBRANA (MAC).

C5, el iniciador del MAC, es una glicoproteína de 190 Kd. Al igual que C3 y C4, se sintetiza como un precursor monocatenario que será procesado a dos cadenas, α (115 Kd) y β (75 Kd), unidas por puentes disulfuro. Carece de tioéster interno porque presenta Ser y Ala en el lugar de la Cys y Glu formadores del enlace, consecuentemente, no se une covalentemente a superficies celulares ni sufre rotura autocatalítica. Tampoco es susceptible a la inactivación por agentes nucleófilos o caotrops.

Las principales características de los componentes del MAC aparecen en la tabla 1.4.

Tabla 1.4. Características de los componentes del MAC.

Componentes	Peso molecular (Kd)	Estructura en cadenas	Cromosoma	Concentración sérica (μ g/mL)
C5	190	α :115 β :95	9q	70
C6	128		5	64
C7	121		5	56
C8	150	α :64 β :64 γ :22	1p 1p 9q	55
C9	79		5p	59

Los componentes finales de la cascada se encuentran relacionados estructural y antigénicamente excepto la subunidad γ de C8. Presentan una identidad de secuencia entre el 21-30%, con una región interna casi libre de Cys, un dominio N-terminal hidrofílico, semejante al que caracteriza al receptor tipo A de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), y, un C-terminal hidrofóbico, compartido con el EGF tipo B.

C6 y C7 son dos β 2-globulinas glicosiladas altamente polimórficas, compuestos de cadenas sencillas de 128 y 121 Kd, respectivamente. A pesar de no tener capacidad enzimática, son inactivadas por inhibidores de serinproteasas.

C8 presenta una arquitectura molecular tricaténaria, muy rica en residuos hidrofóbicos, con dos cadenas unidas por puentes disulfuro, α de 64 Kd y γ de 22 Kd, acopladas de forma no covalente a β , de 64 Kd.

C9, el componente mayoritario del poro, es una glicoproteína de 79 Kd con una alta capacidad de polimerización. Presenta homología parcial con las perforinas^[62] (factores citolíticos de los gránulos citoplásmicos de los linfocitos T citotóxicos y las células "NK" con capacidad formadora de poro), pero éstas son dependientes de Ca^{2+} y carecen de proteínas auxiliares para la polimerización.

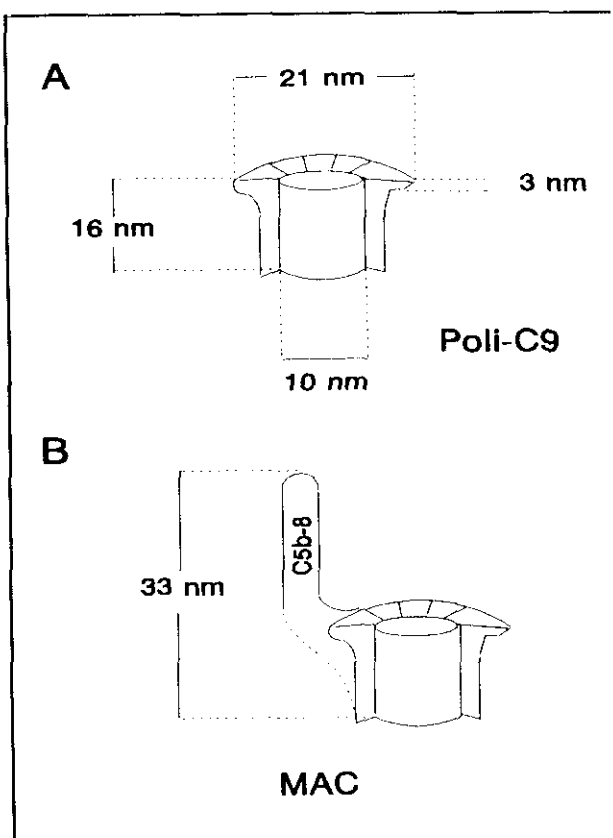


Figura 1.7. MAC. A: Formación de poli-C9; B: Formación del MAC^[63].

El proceso de formación del poro^[63]. Las C5-convertasas clásica (C3b-C4b2a) y alternativa (C3b-C3bBb) rompen la cadena α de C5 en el enlace peptídico Arg⁷⁴-Lys⁷⁵ para liberar C5a (11 Kd), una poderosa anafilotoxina con un 25% de carbohidratos, y provocar, en el resto de la molécula, C5b, un cambio conformacional que inicia la construcción del MAC.

C5b presenta un sitio aceptor para C6, constituyéndose el complejo C5b-6 que estabilizado por la unión de C7 (C5b-7), adquiere la capacidad transitoria de fijarse a membranas celulares. La inserción se produce a través de dominios hidrofóbicos por un incremento en el plegamiento de la estructura β durante la formación del complejo trimolecular, lo que origina una zona de reconocimiento para C8 β . Una vez acoplado C8, el complejo C5b-8, con estructura de varilla (figura 1.7), puede producir una lisis lenta de eritrocitos por la formación de canales de 10 nm.

La subunidad α de C8 actúa dirigiendo y catalizando la polimerización de C9. Cuando 6-18 moléculas del último componente han agregado (C5b-9) queda construido un poro de 0.1 μm de diámetro en el espesor de la bicapa lipídica, causante del proceso lítico en la célula aceptora. En modelos experimentales se ha conseguido la formación de complejos

exclusivamente con C9 (poli-C9), que además de los efectos causados en la permeabilidad, incrementan de forma drástica la superficie de la membrana provocando alteraciones estructurales irreversibles.

El control de la lisis celular se efectúa a través de la **proteína S**. Su unión a C5b-7 o C5b-8 transforma el complejo en hidrofílico impidiendo su acoplamiento a la membrana, aunque manteniendo su capacidad para unir C9, bloqueando la formación de los poros.

Otros elementos reguladores a este nivel son: el HRF (C8bp), que confiere resistencia a las células autólogas, y CD59^[64].

3. FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPONENTES DE LA VIA CLÁSICA.

3.1. EN LA INFLAMACION.

La intervención del C en la respuesta inflamatoria se conoció pronto. Células inflamatorias (macrófagos, monocitos, ..) sintetizan y secretan componentes del C en las zonas de daño tisular, y productos de activación proteolítica de la cascada, C3a, C4a y C5a (anafilotoxinas), están reconocidos como mediadores inflamatorios. En la movilización de las reservas leucocitarias de la médula ósea se ha implicado a un péptido de C3^[65], unas veces asignado C3e^[66] (péptido de 10 Kd del N-terminal de C3d,g) y otras a C3d-K^[67] (fragmento de 41 Kd procedente de la digestión de iC3b con kalicreína que contiene el tioéster).

Las anafilotoxinas son péptidos de 9 Kd liberados de sus moléculas de origen (C4, C3 y C5) por la acción proteolítica de enzimas del C (C1s, C3 y C5 convertasas) en enlaces Arg-X del extremo N-terminal de la cadena α . Ejercen multitud de respuestas biológicas^[68]: inducen cambios en la permeabilidad vascular, promueven la adherencia de neutrófilos al endotelio, contraen la musculatura lisa del íleon de cobaya, liberan histamina de los gránulos de las células cebadas y basófilos sanguíneos, ... Además C5a, la más potente de las tres, ejerce un efecto quimiotáctico (no dependiente de la Arg C-terminal). Son controladas, en plasma, por una carboxipeptidasa N, que elimina la Arg C-terminal, reduciendo o aboliendo su función. La respuesta de C5a es mediada por leucotrienos, mientras que son las prostaglandinas los agentes mediadores de C3a, al menos a nivel pulmonar.

En la última etapa inflamatoria, la eliminación del agente inductor, son fragmentos del C (C3b, C3d, C4b, C4d, ...) unidos a superficies celulares o ICs los que actuarán como opsoninas, se unirán a receptores específicos y promoverán la fagocitosis. Este mecanismo es de gran importancia en la defensa frente a gérmenes Gram +.

3.2. ACLARAMIENTO DE INMUNOCOMPLEJOS.

Hay dos fenómenos íntimamente relacionados con la eliminación de agregados de la circulación: la inhibición de la inmunoprecipitación (IIP), cuyo papel preponderante corresponde a la VC^[69], y la solubilización de inmunocomplejos (SOL), de menor relevancia fisiológica, en la que la VA aparece como principal responsable^[70]. Ambos mecanismos no son producto de reacciones proteolíticas, sino de la intercalación de fragmentos de C entre las moléculas que construyen la red Ag/AC y en ninguno de los dos procesos intervienen los componentes del MAC.

3.2.1. La inhibición de la inmunoprecipitación (IIP).

La precipitación de los agregados ocurre por un doble mecanismo: una fase inmune de asociación del antígeno con el anticuerpo, seguida de una coprecipitación no inmune por interacciones Fc-Fc. Es máxima en el punto de equivalencia (todo el AC ha precipitado), y muy importante en exceso de AC.

Al incubar Ag y AC (IgG, IgM, pero no IgA^[71]) en condiciones de máxima precipitación con suero fresco, se inhibe la formación de ICs. Como un primer mecanismo, la unión de C1, pero no necesariamente su activación^[72], enlentece el proceso de agregación^[73] por impedimento estérico^[74], manteniendo solubles los complejos en los primeros momentos. Inversamente, C1q, a través de sus cabezas globulares, fija distintas moléculas de inmunoglobulinas facilitando las interacciones^[73]. Estos datos otorgan una gran importancia al acoplamiento de C1r y C1s, aunque sus centros activos no se requieran para esta función^[69].

El papel de C4b es controvertido, ya que parece no retardar la IIP. En ausencia de C2, los complejos formados son de un rango más amplio que cuando sólo C1 está presente^[75]. La unión covalente de C4b a los ICs^[72] puede dar cuenta de su mantenimiento en solución o simplemente serían la base estructural para el asentamiento de la convertasa^[72, 74].

A pesar que los procesos anteriores ejerzan un papel iniciador, el mecanismo esencial de la IIP es la unión covalente de C3b al inmunoagregado tras la activación de la VC^[72]. La formación de complejos con el Ag sería la causa que impediría la formación de una red densa. La relación C3b/IgG encontrada en la IIP (2/5)^[76], así como la producción de C5a son menores que en la SOL (1/1)^[77], indicando la necesidad de menor activación de C3, por lo que es suficiente con la VC.

3.2.2. La solubilización de inmunocomplejos (SOL).

Una vez precipitados los complejos, el organismo ha diseñado un sistema, en el que el C es el mecanismo efector principal con el fin de evitar alteraciones patológicas. Czop, J.

& Nussenzweig, V.^[70] encuentran que la incubación de ICs preformados con suero fresco conlleva su solubilización. Este proceso está íntimamente relacionado con la unión covalente de C3b a la red Ag/AC, lo que provocará, debido al gran tamaño de la molécula, la disgregación de la malla por pérdida de uniones Ag/AC^[78] y la rotura de las interacciones Fc-Fc, revelada por el enlentecimiento de la solubilización en complejos formados por F(ab)'₂^[79].

El proceso resolubilizador es altamente dependiente de la clase de AC (mejor con IgG2b e IgM, y muy pobre con IgA), quizá como un reflejo de la capacidad para aceptar las moléculas de C3b^[80]; también de la afinidad (relacionada con la constante de asociación intrínseca de los sitios de unión)^[70, 79] y de la avidéz (tendencia de ambas moléculas a combinarse y formar complejos estables)^[81] del AC por el Ag. Estas dos últimas propiedades están en relación inversa con la SOL.

En la SOL pueden establecerse tres etapas^[82]:

1. Formación de la C3-convertasa a través de la VA o en combinación con la VC, fijando C3b. Este mecanismo es dependiente de Mg²⁺. La VC ejerce un efecto sinérgico, ya que en ausencia de Ca²⁺, C4 o C2, la SOL es menos eficaz^[82], pero ICs pretratados con C1, C4 y C2, sin C3, no la efectúan^[83].

Fujita et al.^[77], trabajando con componentes purificados, demuestran que en ausencia de factor H y factor I, el consumo de C3 se verifica en fase fluída y no hay depósito de C3b sobre los ICs, evitándose la SOL. Además la properdina juega un papel importante en presencia de los dos reguladores^[84].

2. Amplificación absolutamente dependiente de la VA sin requerimientos iónicos. La VC, debido a la menor concentración sérica de C4 y C2 en relación a C3 y factor B carece de una acción preponderante.

3. Resolubilización en ausencia de proteínas y cationes divalentes por un mecanismo de interferencia directa o alostérica generado por C3b unido.

Los ICs resolubilizados no son sometidos a posterior disociación al ser reincubados con suero. Cuando son expuestos a exceso de C, no se unen a los receptores de las células sanguíneas. Varias hipótesis^[83] se dan para explicar este suceso sorprendente:

- C3b unido a ICs por la VA puede tener una configuración distinta a la del incorporado por la VC, que impida el reconocimiento por los receptores.

- la necesidad de un agrupamiento de moléculas de C3b para que se una al receptor. Se ha comprobado una mayor afinidad de CR1 por dímeros de C3b.

- unión de properdina o factor H impidan la interacción con el receptor. Esta hipótesis parece poco probable porque el proceso es irreversible.

3.2.3. Eliminación de inmunocomplejos del torrente sanguíneo.

Cuando un agente extraño o una molécula inmunógena penetran en el sistema vascular, el AC que se han generado contra ella, la bloquea y forma inmunoagregados. Si el AC es activante de C, la VC se dispara y mantiene los complejos solubles. La eliminación de estos ICs se realiza rápidamente por macrófagos tisulares^[85].

Si la VC no es capaz de controlar la agresión, los agregados precipitan. En este momento, el papel solubilizador de la VA es esencial para la salvaguarda del organismo. Si fracasa, se depositan ICs en los tejidos, preferentemente riñón y vasos sanguíneos, ocasionando glomerulonefritis, arteritis, ... Pero si no, estos complejos son procesados vía receptores de complemento (CR1) presentes en los eritrocitos y pueden sufrir la acción proteolítica de factor I. Su destino final es doble (figura 1.8): pueden ser destruidos, junto con los hematíes que los transportan, en el hígado y el bazo, o transportados a macrófagos tisulares de forma pasiva para su degradación^[86].

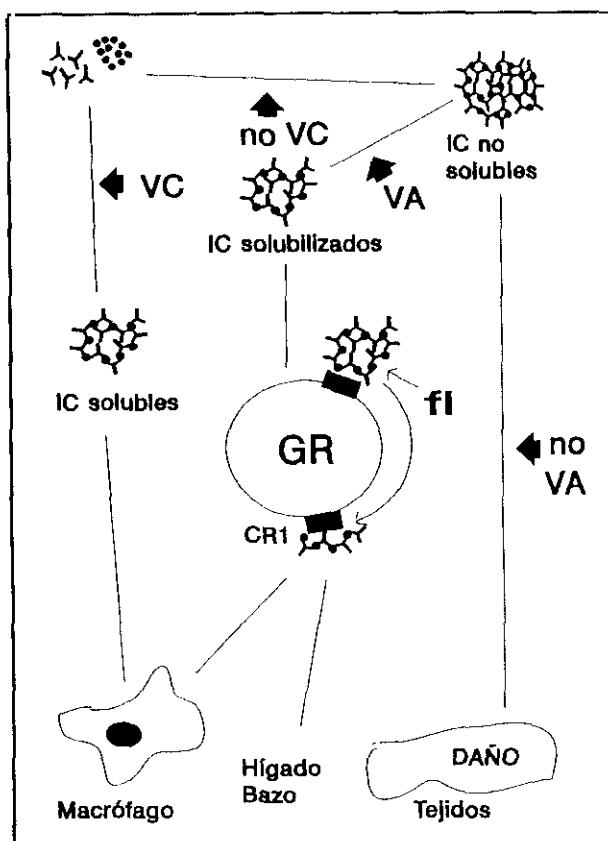


Figura 1.8. Esquema del procesamiento de IC.

3.3. LISIS CELULAR.

Es el resultado final de la activación completa de la cascada del C. Sus últimos componentes se ensamblan (C5b-9_n) para construir poros en la bicapa lipídica de las células extrañas provocando un aumento en la superficie de la membrana y alteraciones osmóticas que ocasionan la muerte celular (ver 1.2.3). Las células nucleadas del organismo poseen distintos mecanismos defensivos para solventar la acción del C, que resultaría letal para la vida:

- inhibidores de la formación del poro, el DAF y el HRF (ver 1.2.1.4).
- procesos de internalización y destrucción de los complejos.
- mecanismos reparadores de membrana.

Durante el proceso evolutivo, algunos agentes patógenos han desarrollado defensas para frenar el ataque del C: las bacterias Gram + resistentes están rodeadas por una gruesa capa de peptidoglucano que impide a los componentes del MAC el acceso a la membrana;

las bacterias Gram - resisten por presentar largas cadenas de O-polisacáridos en su pared, por lo que las proteínas del MAC no llegan a ensamblarse a la envoltura celular. Además, se ha demostrado unión de C1q a las formas R (no capsuladas), pero no a las formas S (capsuladas), que son las más agresivas para el organismo.

En algunas enfermedades autoinmunes, pueden afectarse los mecanismos defensivos y lesionarse los tejidos del huésped.

La VC está implicada en infecciones por bacterias Gram -, tanto en presencia como en ausencia de ACs,, mientras que en las provocadas por Gram +, la lisis es exclusivamente dependiente de ellos. En la activación no lítica, las células bacterianas se revisten de C3b/C4b, *ejerciendo un papel opsonizante para los macrófagos, siendo necesaria una proteína sérica que medie la unión de C4 a la membrana.* La muerte bacteriana sobreviene por un mecanismo complejo: el MAC solamente forma poros en la envoltura bacteriana externa. Se especula con la posibilidad de que la acción del C se desarrolle en zonas donde las dos membranas bacterianas se unen^[76].

Algunos virus con envoltura lipídica, los retrovirus, son activadores del C por la VC y susceptibles del ataque por el MAC. El C es fundamental en el proceso de la neutralización vírica: la interacción de un virus con su AC específico induce la formación de enlaces covalentes entre C4b/C3b y el inmunoagregado, impidiendo la interacción del virus con su receptor celular.

3.4. FUNCION INMUNOLOGICA.

La intervención de los componentes de la VC en la respuesta inmunológica es muy compleja y está siendo sometida a un estudio intensivo. Algunos aspectos merecen especial interés:

- los macrófagos, células presentadoras de antígeno, son capaces de sintetizar y secretar componentes del C^[2].

- la presencia de receptores para componentes del C en células linfoides: en células B (CR1, CR2, ..) y T (MCP).

- la alteración en la producción de linfokinas: la unión de C1q a su receptor inhibe la actividad IL-1 en células linfoblásticas.

- los individuos deficientes en C3 no presentan alteraciones inmunológicas, pero algunos de sus fragmentos influyen en la respuesta inmune: C3b agregado (producido por la VA) puede inducir el crecimiento de células B activadas y mejora el de células T dependientes de IL-2^[87], y alguno de los fragmentos de C3, C3d-k (generado por digestión enzimática con

kaliceína), inhibe la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos y los libera de la médula ósea^[67]. Se ha sugerido un papel para C3a en la generación de células T supresoras^[88].

- el papel de C3 en la producción de células de memoria^[89].

- C4 ejerce un papel controlador en producción de ACs, al menos en cobaya. Individuos deficientes fueron incapaces de producir una respuesta secundaria a Φ X174, que se recupera al suplementar con C4.

4. EL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C4).

4.1 LOS GENES DE C4 EN LA REGION DE CLASE III DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

Se localizan en la zona p21 del brazo corto del cromosoma 6^[90] dentro de la región del complejo de histocompatibilidad^[91], entre los genes de clase I, HLA-B^[92] (a 0.6 cMorgans) y, los de clase II, HLA-DR^[93] (a 1.0 cMorgan)^[94], en desequilibrio de ligamiento con otros dos genes del C, C2 y factor B.

En los años 70 se pensaba que, de forma similar al cobaya, C4 estaría codificado por un solo gen con 3 alelos comunes^[92] y tres menos frecuentes^[95], con duplicaciones en algunos individuos secundarias a la presencia de un gen único^[96]. Awdeh, Z. L. & Alper, C. A.^[97] desarrollaron una nueva técnica para el tipaje de C4 (tratamiento con neuraminidasa previo a la electroforesis) que permitió la distinción de los heterocigotos y llevó a un replanteamiento de los datos estadísticos que finalizó con el diseño de un modelo con dos loci^[98].

Dentro del cromosoma, C2 y factor B están separados 2 Kb y alejados 30 Kb de los genes de C4 que distan entre sí 10 Kb^[93]. La distancia genética entre factor B y C4 es 0.04 cMorgans^[99]. Dos genes de 4.5 Kb que codifican para la 21-OH-hidroxilasa (E.C. 1.14.99.10), una enzima del metabolismo del colesterol cuyo déficit causa la hiperplasia adrenal congénita, han sido mapeados cerca del 3' final de ambos genes de C4^[100, 101] a una distancia de 1.5 Kb^[100]. El gen 21-OH-B codifica para una proteína funcional^[101] de 494 aminoácidos y contiene 10 exones, mientras que su homólogo, el 21-OH-A es un pseudogen con una delección entre los residuos 110 y 112 y una mutación sin sentido, que lo incapacitan para realizar su función biológica^[102].

En 1983, Carroll, M.C. & Porter, R.R.^[103] clonan el gen de C4. El gen corto de C4A consta de 41 exones que codifican para 1744 aminoácidos. Comparte una estructura común con los genes de C3 y α 2-macroglobulina, revelando un posible origen común^[104].

Se han demostrado dos genes de C4 de distinto tamaño: uno de 22.5 Kb, presente en todos los alotipos A y en algunos B, y otro de 16 Kb, en el resto de los alotipos B. Este

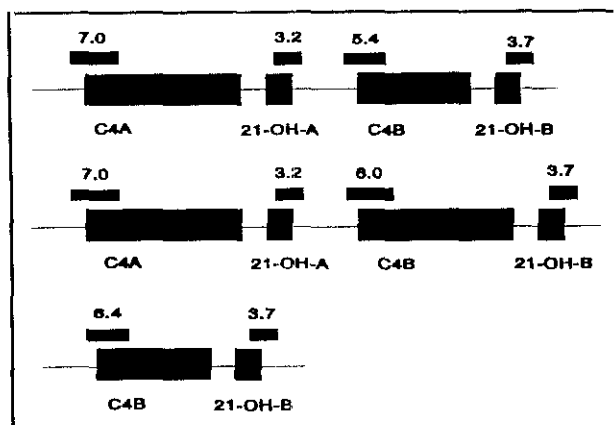


Figura 1.9. Mapeo de la región de C4 y 21-OH usando fragmentos de restricción de TaqI. a. Gen largo C4A y gen corto C4B; b. Dos genes largos; c. Delección de C4A y 21-OH-A.

polimorfismo se debe a un intrón de 6.8 Kb^[105, 106] localizado a 108 bases del sitio de comienzo de la transcripción con la respectiva señal de rotura GT/AG. La endonucleasa de restricción TaqI es capaz de discernir estas estructuras: un fragmento de 7.0 Kb corresponde al gen A largo, 6.0 Kb al B largo, 5.4 Kb al B corto y 6.4 Kb a una delección del gen A^[105]. Del mismo modo, es posible diferenciar los dos genes 21-OH: un fragmento de 3.2 Kb representa el gen A y una hibridación de 3.7 Kb al gen B^[107] (figura 1.9). Todos estos patrones de restricción están asociados a zonas no codificantes de las moléculas, pues las

modificaciones que generan las variantes alélicas no son reconocidas por la enzima utilizada.

Utilizando un procedimiento electroforético seguido por hibridación con BssH II, Dunham et al.^[108], logran discernir los distintos haplotipos de C4: dos genes largos generan un fragmento de restricción de 115 Kb; un gen largo y otro corto, 105 Kb; un sólo gen largo, 80 Kb; y por último, los que presentan sólo un gen corto, 70 Kb.

La región de clase III presenta algunos datos curiosos que dan cuenta de la gran complejidad de esta zona del DNA:

- se ha clonado un gen, expresado en las cápsulas suprarrenales y en células de Leydig tumorales, en la hebra opuesta a la de los genes del C que solapa con el último exón del gen 21-OH^[109].
- entre factor B y C4 se ha mapeado el gen RD con una estructura periódica inusual^[110].

Esta región genética está siendo objeto de múltiples estudios para localizar nuevos genes. Se ha mapeado un gen semejante a la tenascina (proteína de matriz extracelular)^[111] y los genes que codifican para TNF α y β .

No se conoce la razón última por la que varios genes del C, aquellos encargados de formar las convertasas, se encuentran ligados al sistema mayor de histocompatibilidad, aunque podría aventurarse la posibilidad de que exista una ventaja selectiva para los genes de clase I y II, quedando atrapados los de clase III entre ellos.

4.2. ESTRUCTURA DEL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO.

Es una glicoproteína de 205 Kd constituida por tres cadenas polipeptídicas, α , β y γ , de 93, 78 y 33 Kd respectivamente, enlazadas por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes^[112] conteniendo un 7% de carbohidratos^[113]. Por análisis de dispersión de rayos X se presenta como un cilindro elíptico con semiejes de 5.6 x 2.1 nm y 11 nm de longitud^[114].

Tres complejos fucosilados biantenarios formando enlaces N-glucosídicos con las Asn^{843, 1309, 1372} se localizan en la cadena α , la glicosilación en β (Asn²⁰⁸) es del tipo manosa (Man9 GlcNac2), mientras que γ carece de azúcares^[115]. Una zona de sulfatación con tres residuos implicados (Tyr^{1398, 1401, 1403})^[116] se localiza en el dominio $\alpha 4$ (figura 1.10), zona que puede encontrarse próxima en la estructura tridimensional a la región N-terminal de la cadena α (C4a) porque en moléculas desulfatadas hay una reducción de la actividad hemolítica en un 50% y las concentraciones de C1s necesarias para la activación de C4 se incrementan 10 veces^[117].

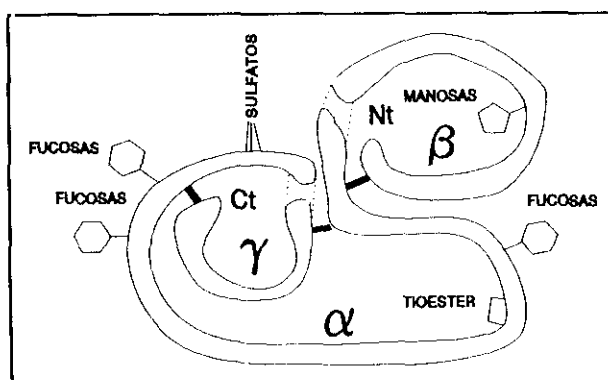


Figura 1.10. Modelo espacial de la disposición de las cadenas de C4 según los datos actuales. Localización de los azúcares y las sulfataciones.

La secuencia de aminoácidos de pro-C4A (figura 1.11), cuya numeración se sigue en este trabajo, fue obtenida a partir del cDNA por Belt y al.^[118] Se prolonga la secuencia codificante de la cadena γ en 420 pb no traducidos con la señal de poliadenilación (ATTAAG) localizada 29 nucleótidos antes del inicio de la cola poli-A.

Los puentes disulfuro quedan establecidos: N-terminal de β ---N-terminal de α ($\alpha 3$), N-terminal de α ---N-terminal de γ y C-terminal de α (Cys¹³⁷⁵)---C-terminal de γ . El resto de las cisteínas, 4 en β , 10 en γ y 6 en α (todas ellas en C4a), posiblemente se vean implicadas en la formación de enlaces disulfuro intracatenarios^[119, 120]. En este punto hay que hacer referencia a la Cys¹¹⁰² extra de C4A, presente en la zona de diferenciación isotópica, y a la Cys⁹⁹¹ formadora de un enlace tioéster con la Gln⁹⁹⁴, oculto en la molécula nativa.

Tras la activación por C1s, una rotura proteolítica en el enlace Arg⁷³⁸-Ala⁷³⁹ (residuos 77-78 de α) libera un polipéptido de 8 Kd de la cadena α , C4a (estudiado con más detalle en 4.6), mientras que el resto de la molécula, C4b, sufre un cambio conformacional con un reordenamiento de las fuerzas moleculares que provocan la rotura del enlace tioéster (adquiriendo la capacidad de interacción con superficiesceptoras) y la exposición al solvente de nuevos dominios. Estas modificaciones se detectan por:

→ Cadena β 40 80
 VLSATFFTLSLQ_KPRLLLFSPSVVHLGVPLSVGVQLQDVPRGQ VVKGSVFLRNPSPNNVPCSPKVDFTLSSERDFALLSLOVPLKDAKSCGLHQLLRGPEVOLVA

120 160 200
 HSPWLKDSLRTTNIQGINLLFSSRRGHFLQTDQPIYNPGQRRVYR VFALDQKMRPSTDTITVMVENSHGLRVKKEVYMPSSIFQDDFIPDISEPGTWKISARFSDG

Glicosilación 240 280
 LES_NSS_TQFEVKKYVLPNFEVKITPGKPYILTVPGHLDQMQLD IQARYIYGKPVQGVAYVRFGLLDEDEGKKTFFRGLESQTKLVNGQSHISLSKAEFODALEKLNMG

320 360 400
 ITDLQGLRLYVAAAIIEITISPGGEMEEAELTSWYFVSSPFLSLDSKTKRHLVPGAPFLQLALVREMSGSPASGIPVKVSATVSSPGSVPEAODIQNTDGSQGVSIPIIP

440 480 520
 QTISELQLSVSAGSPHPAIAIRLTVAAPSGGGPGFLSIEK(W) PDSRPPRVGDTLNLRVAVGSGATFSHYYYMILSRGQIVFMNREPRTLTSTVSFVFDHHLAPSFYFVAF

560 600
 YYHGDHPVANSRLVDVOAGACEGKLESLVDGAKQYRNGESVKLHLE TDSLALVALGALDTALYAAGSKSHKPLNMKGKVFAMNSYDLGCGPGGGDSALQVFOAA

640 Cadena β← →Cadena α 680 720
 GLAFSDGDQWTLRKRRLSCPKEKIT_RKKR_NVNFO KAINELGQYASPTAKRCQDGVTRILPMMRSCQRAARVQQP(L)DCREPLSCCQFAESLRKKSRLDKG

C1s Unión de C4bp 760 800
 QAGLQR_ALEILQ_EEDLDEDD_IPVRSFFPENWLWRVETVD RFQILTLWLPDSLTTHWEIHLGLSLSKTKGLCVATPVQLRVFREFHLHLRLPMSVRRFEQLELRPLVYN

Glicosilación 880 920 Factor I
 YLDK_MLT_VSVHVPVEGLCLAGGGGLAQDVLVPAGSARPVAFS VVPTAAAASLKVVARGSFEFPVGDVSKVLQIEKEGAHREELVYELNPLDHRGR_TLEIP

960 TIOESTER 1000 1040
 GNSDPNMIPDGFNSYVRVTASDPLDTLGSEGLSPGGVASLLRLPRG _CGEQ_ _TMYLAPTAAASRYLDKTEQVSTLPETKDH(I)AVDLIQKGYMRIQOFKA

1080 Zona de diferenciación isotípica 1120
 DGSYAAWLSRD(G)SSTWLTAFVLKVLSLAQEQVGGSPKLOETSNWLLS(I)QI A)QQADGSFQDP(L)C(S)PVL(I)D(H)RMSQGGVLGNDETVALTAFVTIALHHGLA

1160 →Unión de C3b
 VFQDEGAEPKORVEASISKANSFLGEKASAGLLGAHAAITALYALS(T)LT KAPVLIDLL(R)GVAHNNLMAMAQETGDNLVWGSVTG*S*Q*S*NAVSPTPAPRN

1240 Unión de C3b← 1280 Glicosilación Factor I
 PSDPMPQAPALWIETAYALLHLLHEGKAEDMADOAS(A)AWLTROGSFQG GFR(V)STQDTVIALDALSAYWASHTTEERGL_NVL_LSSTGR_NGFKSHAQLNN

1360 Glicosilación Sulfatación Elastasa
 ROIRGLEELQFSLGSKINVKVGGNSGTLKVLRTYNVLDNK_NTT_ _CODLQIEVTYKGVHEVTMEANED_YEYEDY_DELPA_KDDPDAPLOPVTLQLFEG_RRN

α← →Cadena γ 1480 1520
 RRRR_EAPKVVEEQESRVHYTVCIWRNGKVGLSGMAIA DVTLLSGFHALRADLEKLTSLSDRYVSHFETEGPHVLLYFDSVPTSRECVGFQAVQEVVGLVQPASAT

1560 1600 1640
 LYDYNNPERRCSVFYGAPSKSRLLATLCSAEVCQCAEGKCPRRRALERG LQDEGYRMKFCACYPRVEYGFQVKVLRDSRAAFRLFETKITQVLHFTKDVKAAAN

1680 Cadena γ←
 QMRNFLVRASCRRLRLEPGKEYLIMGLDGATUDLEGHPQYLLDSNSWIEEMPSERLCRSTRQRAAACQLNDFLQYGGTGCCQV_

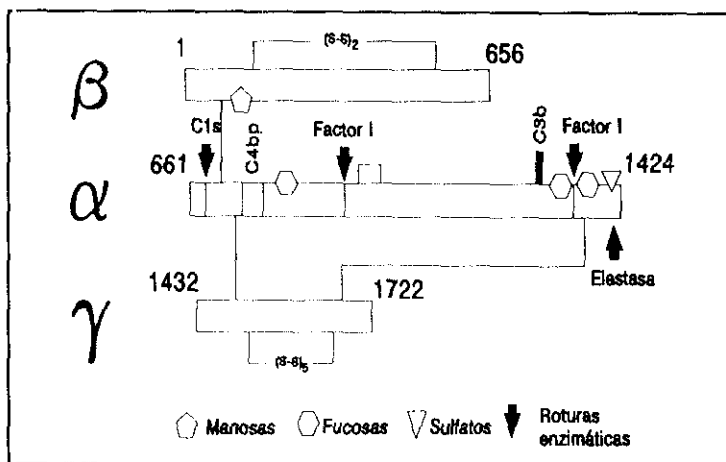


Figura 1.11. Secuencia de aminoácidos de C4A¹¹¹⁸. Los aminoácidos situados entre corchetes [a-a] son los puntos polimórficos^[118, 191, 221, 222]. Las Cys aparecen subrayadas y en negrilla. Entre cuadros negros (—) los puntos de glicosilación, sulfatación, la zona de unión de C4bp y la región del enlace tioéster. Las roturas enzimáticas vienen marcadas por espacios subrayados (). Subrayado el péptido donde se une C3 con las Ser marcadas con *. A la derecha un esquema de los principales puntos funcionales de la molécula de C4.

- diferencias en la captación de ^{125}I entre C4 y C4b por el método de la lactoperoxidasa.

- disminución de la fluorescencia intrínseca^[121].

- estudios de dispersión de neutrones encuentran compactación en C4 nativo que no se observa en C4u (molécula de C4 que tiene hidrolizado el enlace tioéster)^[17].

- se pone al descubierto el sitio de interacción de C4bp, posiblemente situado en una región aniónica en $\alpha 3$ entre el Glu⁷⁴⁴ y el Asp⁷⁵² ^[122]. La base de esta hipótesis es la inhibición de la interacción C4b * C4bp por heparina, un polisacárido sulfatado con un gran número de cargas negativas^[123].

- la aparición del sitio de unión covalente de C3b a C4b durante la activación de la VC en la región comprendida entre la Ala¹¹⁸⁶ y la Lys¹²⁵⁹. En esta zona existen 12 hidroxiaminoácidos candidatos al enlace, de los que 6 se conservan en ratón^[124]. Estudios más recientes por mutagénesis dirigida, cambiando las Ser¹²¹⁷ y Ser¹²¹⁹ por Ala, eliminan la unión de C3b a C4b, considerándose como el punto de interacción entre ambas moléculas^[37].

La cadena β parece encontrarse más oculta en la molécula nativa:

- su digestión trípica es posterior a la rotura de la cadena α ^[28].

- no se ve afectada por el tratamiento con neuraminidasa a pesar de tener un hidrato de carbono con ácido siálico. Además, estos azúcares tipo manosa no han podido ser procesados a fucosas por las manosidasas del aparato de Golgi^[117].

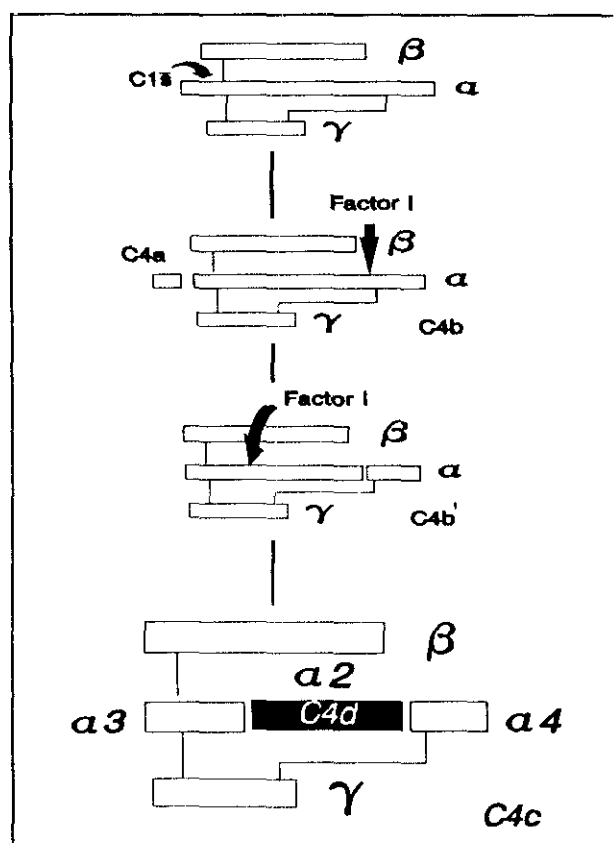


Figura 1.12. Activación y degradación enzimática de C4.

A pesar de todo, se han fabricado ACs monoclonales contra ella^[125] y se ha sugerido que la Arg⁴⁵⁸ contribuye a la unión de C5 a la C5-convertasa^[126].

Pocos datos se tienen sobre la funcionalidad y la disposición espacial de la cadena γ . Ejzemerg et al.^[127] la implican en la generación de SAC42a (eritrocitos revestidos con hemolisina a la que se unen los componentes C4b y C2a) porque reduciendo con DTT detectan pérdida de actividad hemolítica simultánea a su desprendimiento.

Como se describió en un apartado anterior, factor I en presencia de C4bp (también CR1) es el responsable de la degradación proteolítica de C4b. La acción enzimática se verifica en dos etapas (figura 1.12). La primera conlleva la rotura

proteolítica en el enlace Arg¹³¹⁸-Asn¹³¹⁹ con generación de dos fragmentos en la cadena α , uno de 70 Kd donde se une C4bp, y otro de 16 Kd ($\alpha 4$). La molécula así formada, C4b', conserva su actividad funcional^[128]. En un segundo paso, se escinde el enlace Arg⁹³⁷-Thr⁹³⁸ para dar tres fragmentos: $\alpha 2$ (C4d) de 45 Kd con un 6% de carbohidratos, con capacidad de unión a las superficiesceptoras por contener el enlace tioéster; $\alpha 3$ (N-terminal de la cadena α') y $\alpha 4$ (C-terminal de la misma), de 25 y 12 Kd respectivamente, glicosilados en mayor proporción, 10% en $\alpha 3$ y 22% en $\alpha 4$ ^[129]. Ambos polipéptidos permanecen unidos a β y γ por los enlaces disulfuro explicados anteriormente.

La estructura de C4c y C4d por análisis de dispersión de neutrones propone una arquitectura de dos elipsoides lamelares con dimensiones de 8 x 18 x 9 nm (C4c) y 4 x 12 x 9 nm (C4d) que se conectan perpendicularmente para conformar la molécula completa^[17].

4.3. BIOSINTESIS Y SECRECION.

C4 es sintetizado, por hepatocitos^[130], macrófagos peritoneales^[131], células epiteliales pulmonares tipo II^[132], células epiteliales de los túbulos renales^[133] y la línea monocítica U937 inducida por interferon- γ ^[134], como un precursor monocatenario^[135] carente de azúcares y de péptido líder (pre-pro-C4), cuyo peso molecular es 5 Kd menor que la forma secretada (pro-C4), que se encuentra presente en plasma y suero, representando un 8% del C4 sanguíneo total. Ninguna de las dos moléculas presenta todavía actividad hemolítica.

En el retículo endoplásmico, pre-pro-C4, es glicosilada con azúcares tipo manosa responsables del aumento de peso molecular en pro-C4.

Antes de verificarse su secreción, la molécula precursora sufre varias modificaciones:

- la sulfatación de residuos Tyr en la porción C-terminal de la cadena α ^[136] (ver 4.2). Este hecho es común a otras proteínas plasmáticas, como fibrinógeno, gastrina y colecistoquinina.
- formación del enlace tioéster (ver 4.4).
- la configuración definitiva de los puentes disulfuro, bloqueada por tunicamicina o análogos de la treonina (β -OH-nor-valina), ambos inhibidores de la glicosilación^[137].
- reprocesamiento en el aparato de Golgi de los carbohidratos para transformarlos del tipo manosa al tipo fucosa. Estos dos últimos puntos parecen estar acoplados.

Posteriormente pro-C4, cuyo extremo N-terminal corresponde a la cadena β ^[138, 139], sufre un procesamiento proteolítico extracelular por una proteasa del tipo plasmina^[140] o del tipo tripsina más una carboxipeptidasa^[118], para transformarse en la molécula activa trícataenaria.

Dos formas glicosiladas, parcialmente procesadas, correspondientes a las cadenas β - $\alpha + \gamma$ (168 + 33 Kd) y $\beta + \alpha - \gamma$ (67 + 125 Kd), aparecen en plasma en una proporción del 5%

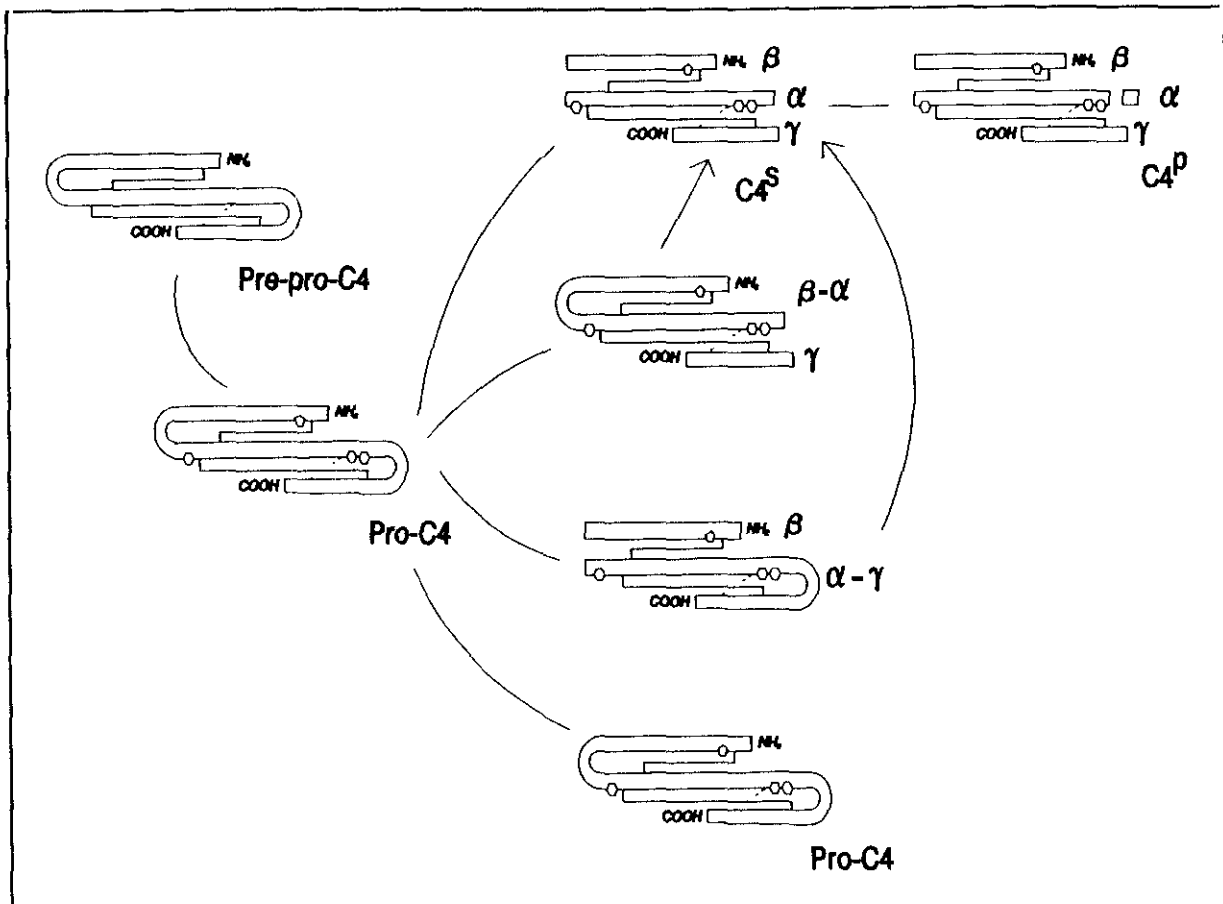


Figura 1.13. Modelo del procesamiento de C4. Modificado de [139]. Las cuatro estructuras de la derecha se encuentran presentes en plasma.

(figura 1.13). No se han encontrado intracelularmente, y ambas, mantienen el enlace tioéster intacto. Su vida media es reducida y pueden transformarse en la molécula mayoritaria en plasma, $C4^P$ ^[141]. Carecen de actividad hemolítica y no son escindidas por C1s (α - γ si lo hace cuando la concentración de C1s es elevada), indicando la necesidad de un procesamiento posterior que suministre la conformación apropiada para su eficaz activación^[142].

Por inmunoprecipitación se detecta una forma tricaténaria, $C4^S$, con actividad hemolítica, que posee un péptido adicional de 5 Kd en el extremo C-terminal de la cadena α . $C4^S$ no sufre autólisis en las condiciones en las que se rompe la cadena α de $C4^P$, por lo que este fragmento de 5 Kd puede estabilizar el tioéster durante la síntesis, secreción y procesamiento de la molécula, especulándose con la posibilidad de que actúe como regulador en la biosíntesis^[143]. La adquisición de la estructura definitiva depende de una metaloproteasa del tipo elastasa^[144] (el procesamiento se bloquea con 1,10 fenantrolina) que rompe el enlace Ala⁷⁴⁸-Lys⁷⁴⁹ en la cadena α , liberando un polipéptido de 20 residuos^[145]. Este tipo de preactivación se ha descrito en el colágeno. Recientemente se ha demostrado el ataque de componentes del complemento (C3, C4, C5, C6, C7, C8 y C9) por metaloproteasas de *Serratia liquefaciens*^[146].

La regulación de su biosíntesis es poco conocida. Algunos trabajos implican a la propia

molécula de C4, capaz de inhibir su propia síntesis afectando la transcripción o la modificación post-transcripcional del m-RNA^[147]. Por otro lado, ACs anti-C4 suprimieron su síntesis y secreción en macrófagos peritoneales^[148], efecto que revierte por cAMP^[149]. En estudios de inhibición de la glicosilación con tunicamicina, se bloquea la secreción de proteínas del complemento en macrófagos de cobaya y la forma no glicosilada sufre un catabolismo más rápido^[150].

Un factor soluble, FsC4, se considera responsable en la regulación de la producción de C4 por macrófagos esplénicos^[151].

4.4. EL ENLACE TIOESTER: CLAVE FUNCIONAL. EL PROCESO AUTOCATALITICO.

C3, C4 y $\alpha 2$ -macroglobulina en estado nativo presentan una región de alta homología Gly-Cys-Gly-Glu-Glu en la que se forma un anillo de tiolactona de 15 eslabones por la síntesis de un enlace tioéster interno^[152, 153] entre la Cys y el segundo Glu (codificado Gln a nivel de DNA), con una arquitectura espacial planar^[154] (figura 1.14). Estas tres proteínas se caracterizan por la formación de enlaces covalentes con moléculasceptoras, determinantes de su funcionalidad biológica, de los que el tioéster es responsable tras un proceso de activación proteolítica generado por distintas enzimas: C1s en C4, las C3-convertasas en C3 y varias proteasas en $\alpha 2$ -macroglobulina.

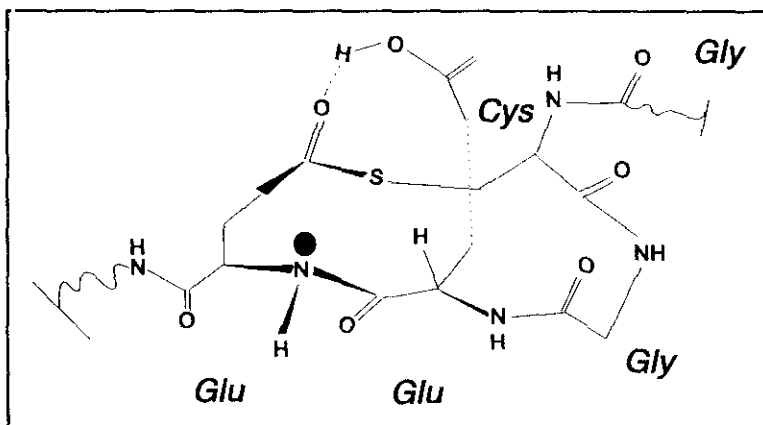


Figura 1.14. Estructura planar del enlace tioéster ^[155].

Es altamente reactivo y sensible a la presencia de aminas (metilamina^[155], hidroxilamina^[156], cadaverina, putrescina,...), amoníaco, agentes caotrópicos^[53] ... y se inactiva por la configuración de la red de hielo^[157] en los procesos de congelación-descongelación^[158].

Se han sugerido varios mecanismos para su síntesis entre la Cys⁹⁸¹ y la Gln⁹⁹⁴ en el fragmento C4d de la cadena α :

1. Activación de la Gln por un proceso enzimático originándose una forma láctica que isomerizaría para dar el tioéster^[159].

2. Por medio de transglutaminasas, enzimas que contienen un SH en su centro activo, se catalizaría la construcción de un enlace γ -glutamil- ϵ -aminolisina utilizando como

intermediario el S- γ -glutamyl-cisteína con pérdida del amonio original de la glutamina^[160].

3. Formación espontánea. Pangurn, M.K.^[161, 162] hidrolizando el tioéster con amonio a baja temperatura, atrapa un intermediario carente de funcionalidad, capaz de resintetizar el tioéster recuperando la capacidad autolítica, la función

hemolítica y la unión a superficies receptoras. Los residuos implicados en el mantenimiento de la conformación proteica idónea para su biosíntesis parecen ser: Pro¹⁰⁰⁷, Glu¹⁰¹², Gln¹⁰¹³ y Pro¹⁰²⁰, ya que al reemplazarse por Gly, Gln, Asn y Gly, respectivamente, alteran sus propiedades características^[163].

Iijima et al. han logrado caracterizar un factor soluble que parece responsable de la formación del enlace tioéster^[164].

La especificidad de reacción de las moléculas portadoras del tioéster es variable: C4A y α 2-macroglobulina forman enlaces amida, mientras que C3, C4B y C4 murino prefieren ésteres. Esta reactividad está relacionada, como se verá más tarde (I.4.7), con los residuos de la zona isotípica: Leu¹¹⁰⁵-Asp¹¹⁰⁶ en C4A, e Ile¹¹⁰⁵-His¹¹⁰⁵ en C3, C4B y C4 de ratón. La α 2-macroglobulina no es muy homóloga en esta zona y sustituye el Asp¹¹⁰⁶ (C4A) por Asn (figura 1.15). Es importante hacer notar, que todas intervienen en procesos de aclaramiento de material exógeno de la circulación general y en la reacción inflamatoria.

El enlace tioéster, junto a una conformación estable de los puentes disulfuro, es el causante del proceso autocatalítico de C3 y C4^[139]. La autocatálisis de pro-C4 ocasiona dos fragmentos, β -NH₂ α de 118 Kd y COOH α - γ de 93 Kd. La

eficacia del mecanismo sobre las dos formas parcialmente procesadas (β - α + γ y β + α - γ) es diferente: mientras α - γ sufre autólisis con facilidad (93 Kd + 40 Kd), β - α es más resistente (118 Kd + 60 Kd)^[142] (figura 1.16).

La incubación de C4 a 75°C fragmenta la cadena α

Proteínas	Zona del tioéster	Zona isotípica
C4A humano	RGCGEQTM	FQDPCPVLD/RSM
C4B humano	RGCGEQTM	FQDLSPVIHRSM
C4 murino	QGCAEQTM	FHDPCPVIHRRAM
C3 humano	SGCGEQNM	FQEDAPVIHQEM
α 2-macroglobulina	YGCGEQNM	FRSSGSL LNNAI

Figura 1.15. Secuencias en la región del tioéster y en la zona de diferenciación isotípica^[181].

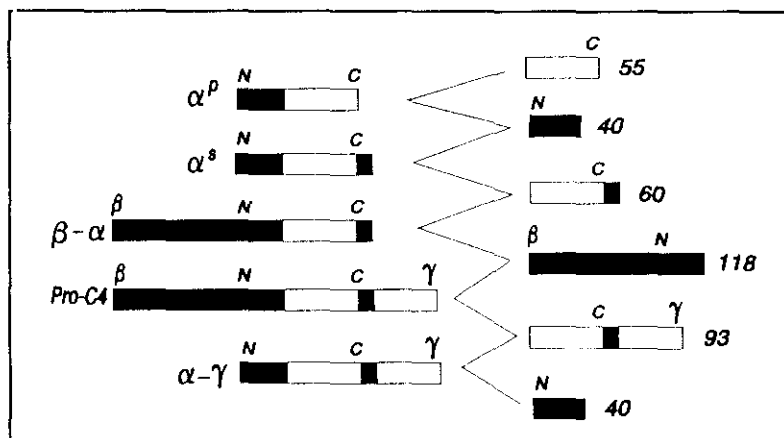


Figura 1.16. Fragmentos autolíticos^[140]. Los números de la derecha corresponden al peso molecular.

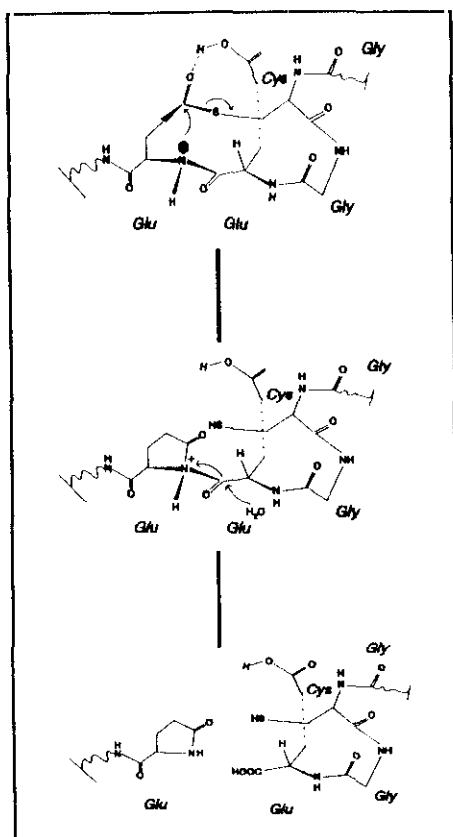


Figura 1.17. Mecanismo de autocatálisis ácida general intramolecular^[167]. Se aprecia la formación de un piroglutámico N-terminal.

en dos segmentos, de 59.5 y 43.5 Kd respectivamente^[155]. En presencia de SDS o cloruro de guanidinio, a 37°C, se obtienen dos polipéptidos semejantes a los anteriores, con el grupo SH del tioéster en el fragmento de 40 Kd y un piroglutámico N-terminal en el de 54 Kd (también en C3 y $\alpha 2$ -macroglobulina)^[165]. Esta autocatálisis se previene por tratamiento con 2- β -mercaptoetanol o agentes nucleófilos que destruyen el enlace^[166].

Dos mecanismos se han propuesto como generadores de autocatálisis:

- un ataque nucleófilo sobre el tioéster por parte del enlace peptídico N1 o N2 asistido por el grupo carbonilo desprotonado del glutámico, para dar una imida como intermediario^[153].

- un mecanismo de catálisis ácida general intramolecular del enlace peptídico sobre el tioéster asistida por la formación de un puente de hidrógeno entre la cadena lateral del primer glutámico, no desprotonado, y el oxígeno carbonílico del tioéster (figura 1.17)^[167]. Es necesaria la presencia de un microambiente ácido que favorezca la protonación.

En principio, parece más verosímil el primero, puesto que al pH celular los grupos COOH del Glu se encuentran desprotonados y su conformación ejerce un grado de menor distorsión sobre la molécula.

Concluyendo, el enlace tioéster, interviene:

- en la estabilización de la configuración nativa.
- es el origen del grupo carbonilo reactivo que forma los enlaces covalentes con las superficiesceptoras durante la activación del C.
- está implicado en la rotura autocatalítica de la molécula.

4.5. LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS CHIDO Y RODGERS.

Se encuentran presentes en células sanguíneas (preferentemente eritrocitos), plasma y suero de individuos sanos politrasfundidos. Al comprobarse que individuos homocigotos para C4F (C4A) y C4S (C4B) eran, respectivamente, Chido (Ch) y Rodgers (Rg) negativos, y los individuos heterocigotos, C4FS, eran Ch + Rg + ^[168], se consideró a la molécula de C4 su portadora.

Estos antígenos se localizan dentro del fragmento C4d^[169], en un péptido tríptico glicosilado (Ch y Rg no se modifican por tratamiento con neuraminidasa indicando la no participación de enlaces O-glucosídicos en su constitución^[170]), de 30 Kd en C4A y 28 Kd en C4B, con 23 aminoácidos menos en el extremo N-terminal y de 10-15 en el C-terminal que C4d y heterogéneo en cuanto a carga^[171]. En su interior se detectan 5 posiciones polimórficas: Leu--Pro¹¹⁰¹, Ser--Cys¹¹⁰², Ile--Leu¹¹⁰⁵, His--Asp¹¹⁰⁶ y Gly--Asp¹⁰⁵⁴ que podrían ser las responsables de las diferencias antigénicas entre los dos grupos serológicos^[172]. Otros estudios^[173], casi contemporáneos, sugirieron un cierto papel, no corroborado posteriormente, a la región $\alpha 4$ de C4c en la formación de dichos epítomos, ya que este fragmento neutralizaba los sueros anti-Ch y anti-Rg.

Cuando los sistemas técnicos se perfeccionan, aparecen datos controvertidos:

- el alelo C4A1 que tendría que ser Rg + , resulta Ch + ^[174] y, C4B5 puede subdividirse en dos grupos, uno Ch + y otro Ch - ^[175, 176].
- existían casos en la literatura de individuos carentes de C4B que presentaban reactividad Ch ^[177].
- en ensayos serológicos rutinarios surgen inhibiciones parciales (p.i.) que se transmiten como caracteres recesivos en estudios familiares^[178].

Estudios con plasmas p.i. llevan a Giles, C.M. a diferenciar dos determinantes Rg y seis Chido^[179, 180]. En análisis de fragmentos de restricción con EcoO 109, Rg1 presenta un fragmento de 565 pb, mientras que Ch1, 458 pb^[181].

Se han descrito cuatro zonas polimórficas (figura 1.18) relacionadas con los epítomos de los determinantes Ch y Rg: la región I implica los residuos D--G¹⁰⁵⁴; la II está constituida por LSPIVH--PCPVLD (1101-1106), responsable de las diferencias isotópicas ^[182]; la III, S--N¹¹⁵⁷ y la IV, ADLR--VDLL (1188-1191).

Cuando varios laboratorios recopilan sus datos, se llega a las siguientes conclusiones^[183]:

- No se encuentra Rg2 en ausencia de Rg1. Ambos pueden no expresarse sobre algunos alelos de C4A, pero éstos poseerán determinantes Ch.
- Rg1 y Ch1 parecen ser alternativos.
- Todas las moléculas C4B expresan Ch4, y las que son Ch1, 2 y 3 también expresan Ch4, 5 y 6, pero no Rg1 ni Rg2.
- Ch2 y Ch5 están relacionados y nunca se separan sobre C4B.
- Ch3 engloba a Ch1 y Ch6.
- Ch2 y Ch4 parecen corresponderse con los residuos isotópicos de C4B y nunca aparecen en C4A.

No existe una correlación directa entre los determinantes Ch y cambios en aminoácidos: una variación en la secuencia puede envolver varios epítomos, por lo que deben

de existir epítomos conformacionales (Ch2 y Ch3) frente a otros de carácter más secuencial (Ch1, Ch4, Ch5 y Ch6).

El determinante Rg1/Ch1 está constituido por la región IV; Rg2 sería alternativo a Ch6 o Ch3, relacionados con III y IV, mientras que Ch2 envolvería a I (Ch5) y II (Ch4) (figura 1.18). La zona isotópica en C4A (PCPVLD) no presenta características inmunógenas, debido, posiblemente, a las restricciones que imponen las dos prolinas. Esta distribución explica porque C4A1 (Rg-) y C4B3 (Rg-) son idénticos en las todas las zonas polimórficas excepto en la región isotópica^[182].

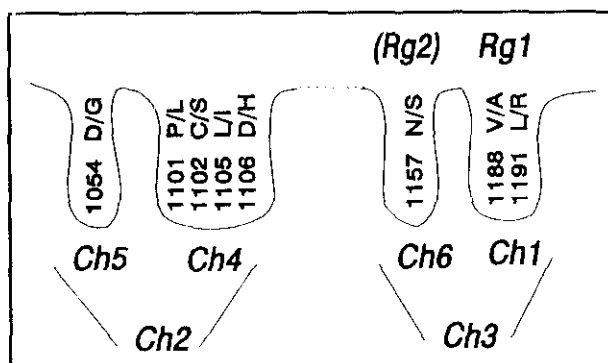


Figura 1.18. Posible distribución de los determinantes Chido y Rodgers en C4d.

¿Cuál es el mecanismo por el que un fragmento de C4 se deposita sobre los eritrocitos de un mismo individuo? Varias hipótesis se han establecido:

1. Activación de C4 en fase soluble por C1. Se ha documentado activación espontánea de C1 "in vitro" e "in vivo" en el edema angioneurótico hereditario^[184].
2. Por un mecanismo semejante a la iniciación de la VA con rotura espontánea del tioéster originándose C4u (iC4).
3. Activación de C4 por enzimas no pertenecientes a la cascada del complemento originando "C4-like"^[26].
4. De forma patológica, en enfermedades con ICs circulantes o autoACs frente a eritrocitos (anemias hemolíticas autoinmunes). Estos mismos mecanismos en bajas proporciones darían como resultado el depósito fisiológico de C4 sobre el hematíe.

En los tres primeros casos, los derivados de C4 se unirían covalentemente al hematíe y serían procesados, por factor I en presencia de C4bp, a C4c y C4d, portador del determinante antigénico. En el cuarto, los ICs-C4b se acoplarían vía CR1, también cofactor de factor I.

Los dos primeros mecanismos pueden diferenciarse en individuos deficientes en C1. Si C1 fuese el causante de la activación, los determinantes Ch y Rg se encontrarían en baja proporción, permaneciendo constantes si se autoactiva C4^[185]. Recientemente, Giles et al.^[186], ha encontrado expresión antigénica Ch/Rg en pacientes deficientes en C1q.

4.6. C4a: LA TERCERA ANAFILOTOXINA.

Durante la activación de la VC, C1s desprende de C4^[24] un péptido muy básico de 77 aminoácidos (8650 daltons) carente de triptófano, histidina e hidratos de carbono^[187, 188], con

aminoácidos (8650 daltons) carente de triptófano, histidina e hidratos de carbono^[187,188], con un punto isoeléctrico cercano a 9.0. Presenta una débil actividad biológica cuando se compara con sus homólogas C3a y C5a, dos potentes anafilotoxinas. Produce la contracción de la musculatura lisa del íleon (dosis 1 μ M), un incremento en la permeabilidad vascular (dosis 1 nM) y reacciones eritematosas en la piel del cobaya^[189], a través de su pentapéptido C-terminal, Ala-Gly-Leu-Gln-Arg, que se diferencia en Ala⁷³ y la Gln⁷⁶ de C3a, considerándose estas sustituciones como las causantes de la reducción funcional^[190].

Estudios de dicroísmo circular excluyen una contribución importante de este fragmento al ordenamiento molecular de C4 y predicen una alto porcentaje de α hélice, más del 40%, en su estructura^[191].

Hugli et al.^[190] han propuesto que la actividad kinina en el edema angioneurótico hereditario, producido por el déficit de C1-Inh, sea causada por un exceso de C4a generado por la exacerbación de la VC.

4.7. DIFERENCIAS ENTRE LOS ISOTIPOS C4A Y C4B.

A pesar de las mínimas permutaciones en la secuencia, poco más de 15 sustituciones en los 1722 aminoácidos^[118,192], las propiedades de ambos grupos de moléculas son bastante diferentes (tabla 1.5):

1. C4A es más ácido^[118] y presenta una cisteína extra, lo que posiblemente determina su mayor inhibición por penicilamina (β - β -dimetil cisteína)^[193].

2. En geles de bajo reticulado la cadena α de C4A presenta un peso molecular aparente de 96 Kd, 2 Kd mayor que la cadena α de C4B^[194].

3. La unión de C4A a ICs es 3-4 veces mayor que la de C4B^[195,196]. Cuando el aceptor es una célula, se invierten las preferencias, siendo más eficaz C4B. Existen dependencias celulares en la formación del enlace: las no nucleadas, eritrocitos, depositan mayor cantidad de C4B en sus membranas que las nucleadas, posiblemente por una mayor proporción de grupos OH en su superficie, aunque la glicoforina A, rica en grupos hidroxilo, es un mejor aceptor para la transacilación por C4A^[197].

4. En la IIP, C4A es ligeramente más efectivo^[198,199]. Este isotipo incrementa la inmunoadherencia^[200] y la unión a CR1^[200]. Todo esto explicaría, en parte, el mayor riesgo a síndromes de lupus eritematoso de los individuos C4AQ0^[201].

5. C4A reacciona preferentemente con grupos amino. La modificación química de restos NH₂ en la superficie aceptora, inhibe su unión^[197]. En estudios de reactividad frente a pequeñas moléculas se acrecientan las diferencias isotópicas. La constante de afinidad frente

a glicerol es casi 12 veces mayor para C4B ($k'/k_0^{20} = 15.5 \text{ M}^{-1}$) en relación a C4A (1.3 M^{-1}). Lo contrario ocurre en la unión a glicina: la constante de afinidad para C4A (13400 M^{-1}) es dos órdenes de magnitud mayor que la de C4B (119 M^{-1}). C4 de ratón, una molécula híbrida en la zona de diferencia isotópica (Pro-Cys-X-X-Ile-His), se comporta como C4B ^[202] (figura 1.15).

Se ha propuesto un cierto papel para el pH en la reactividad del tioéster. Sólo la forma desprotonada del grupo NH_2 es nucleófila, mientras que el grupo OH no se verá afectado por el pH de la zona de interacción. Cuando se utilizan alcoholes para inhibir la unión de C4 a las moléculas aceptoras, no se observa ninguna influencia por la longitud de la cadena lateral, pero los alcoholes secundarios y terciarios son menos eficaces en el proceso inhibitorio ^[203].

6. También hay diferencias en la actividad hemolítica: C4B lisa mejor eritrocitos de carnero que C4A ^[196, 199, 204, 205], debido a la acción combinada de dos factores: una mayor presencia de grupos OH en las superficies celulares y la mayor unión de C5 a la C3-convertasa formada con el isotipo C4 ^[206].

7. Los alelos de C4B presentan, generalmente, determinantes antigénicos Ch, en contraposición a las variantes de C4A que son, mayoritariamente, Rg+ (para más detalles ver 1.4.5).

8. En la respuesta humoral, cobayas C4 deficientes reconstituidos con C4A tienen respuesta secundaria y realizan el cambio de clase de IgM a IgG, lo que no ocurre con C4B ^[207].

9. Hay evidencias de una menor incorporación de metilamina en C4A ^[196].

Tabla 1.5. Principales diferencias entre los isotipos de C4.

		C4A	C4B
Movilidad electroforética	Gel de agarosa	Ácida (rápido)	Básica (lenta)
	SDS-PAGE de bajo reticulado (cadena α)	96 Kd	94 Kd
Estructura	Antígenos Ch/Rg	Preferente Rg	Preferente Ch
Reactividad del tioéster	Actividad hemolítica	Baja	Alta
	Unión covalente	Mejor ICs	Mejor células
	Tipo de enlace	Amidas	Ester
Funcionalidad	Inmunoprecipitación	Eficaz	Poco eficaz
	Respuesta humoral	Positiva	Negativa

Carroll et al.^[208] [R74] estudiaron por mutagénesis las bases moleculares de las diferencias funcionales. La sustitución del Asp¹¹⁰⁶ (C4A) por His (C4B) da cuenta de la variación en la actividad funcional y en la naturaleza química del enlace con las superficiesceptoras. Además, el reemplazamiento de His¹¹⁰⁶ por Ala (entrada de un residuo neutro) incrementa la unión a ICs sin reducción de la actividad hemolítica, sugiriendo que la posición 1106 no es catalítica sino de interacción electrostática y/o estérica. Su papel es la selección de los sitios de unión a los aceptores (no juega un papel en la catálisis básica general como estimaron Isenman, D.E. & Young, J.R.^[197]). El cambio de Leu¹¹⁰¹ (C4B) por Pro (C4A) convierte electroforéticamente C4B en C4A; no hay efecto cuando se sustituyen los aminoácidos de las posiciones 1105 y 1106, pero se observa un producto electroforético intermedio por la permuta de Cys¹¹⁰² por Ser, con una pérdida de actividad hemolítica y de unión a ICs del 30-40%. No parece existir correlación entre el cambio electroforético y la unión a inmunoagregados.

Estos mismos autores concluyen que cuando los grupos amino no son repelidos en su acercamiento al aceptor, se formarán enlaces amida, mientras que si la His¹¹⁰⁶ ejerce su efecto repulsivo, los enlaces serán tipo éster.

4.8. POLIMORFISMO DE C4 EN EL HOMBRE.

A finales de los años 60 y comienzo de los 70, utilizando la técnica de inmunoelectroforesis cruzada, se demostró el polimorfismo de C4^[209, 210, 211]. La mayoría de las sustituciones de aminoácidos ocurren en la región C4d, que contiene el grupo tioéster reactivo. Brevemente, resumiremos las variantes más significativas:

1. A nivel del tamaño del gen: existen alelos con un gen largo de 22 Kb y otro corto de 16 Kb (I.4.1).

2. Según la movilidad electroforética, se han descrito más de 35 variantes alélicas entre los dos loci de C4 con dos alelos dominantes: C4A3 y C4B1 (figura 1.19)^[212]. Las principales posiciones polimórficas se ven en la figura 1.11.

Especial relevancia tiene C4A6 que presenta la misma reactividad que

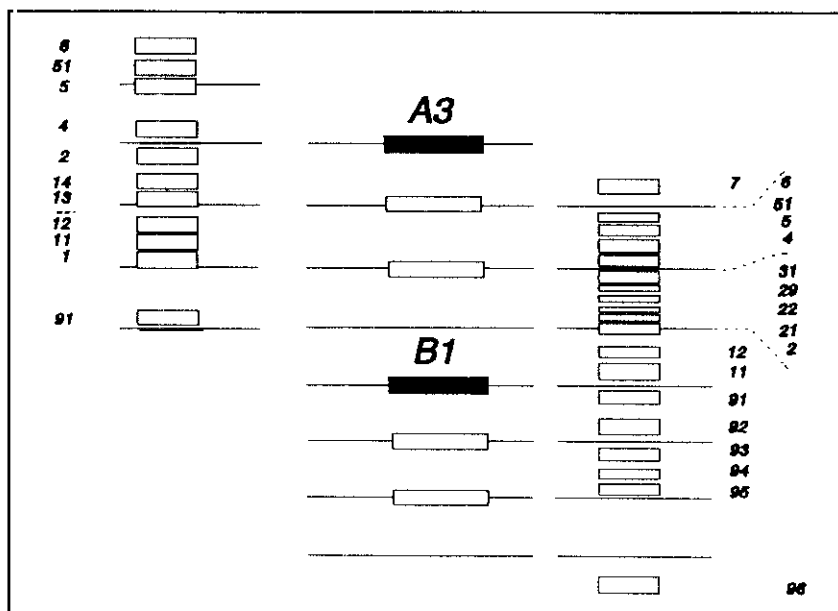


Figura 1.19. Posiciones electroforéticas relativas de los alotipos de C4. Excepto para C4A3 y C4B1, solamente aparece la banda principal.

los otros alotipos de C4A, excepto en la capacidad de formación de la C5-convertasa^[213]: el número de sitios de alta afinidad para C5 está reducido^[206], lo que explicaría su baja actividad hemolítica^[174]. Utilizando mapeo de restricción con BglI, C4A6 presenta dos bandas de 10.7 y 3.8 Kb, en contraposición a una única banda de 14.5 Kb en los demás alotipos ensayados^[214]. La base molecular de esta alteración es la sustitución en la cadena β de la Arg⁴⁵⁸ por Trp^[215].

3. Existen duplicaciones, relativamente frecuentes (C4A-0.65 y C4B-0.87%^[216]), perpetuadas en algunos supratipos del complejo de histocompatibilidad ^[96, 217, 218]. Algunos análisis de duplicaciones por RFLPs son contradictorios con los datos electroforéticos: una estructura de 2 C4A y 1 C4B (electroforesis) mostró ser 1 C4A y 2 C4B en el análisis genético.

4. Estudios genéticos muy finos están siendo capaces de distinguir subtipos dentro de las variantes alotípicas. C4A3, uno de los más frecuentes en la población caucásica, se ha subdividido en varios grupos^[219].

5. Se ha detectado polimorfismo en la cadena β por PAGE-SDS de bajo entrecruzamiento^[220], con la cadena β H (pesada) 3 Kd mayor que β L (ligera). Se ha publicado un suero anti-cadena β L relacionado con el determinante antigénico Rg2^[221].

6. Existen haplotipos extendidos del tipo "t-like", o sea, con tendencia a la supresión del sobrecruzamiento. Es el caso del supratipo A1 B8 DR3 SC01 GLO2 que se transmite por línea masculina, mientras que el A1 B8 DR3 SC01 GLO1 no tiene alterado el sobrecruzamiento y es de transmisión mendeliana^[222].

7. En algunos pacientes con glomerulonefritis proliferativa se observa una variante no hereditaria con una movilidad electroforética entre C4B2 y C4B3, posiblemente descrita con anterioridad como C42.9^[223].

8. Por último, el análisis por RFLPs con PvuII^[104] determina variantes en C4a. El alelo C4A3a tiene reemplazada la Pro⁷⁰⁷ por Leu^[215].

Como base molecular para el amplio polimorfismo detectado figura un mecanismo de conversión génica^[182, 224] (favorecido por el alto contenido en G/C del DNA de C4), apoyada por la presencia de duplicaciones de un isotipo en ausencia del otro (por ejemplo C4A3,A2,Q0 o C4AQ0B1,B2)^[225, 226, 227] junto con mutaciones puntuales^[228] y deleciones alélicas.

Su importancia biológica se centra en la capacidad que tendrían las diferentes formas alotípicas para reaccionar con distintas estructuras localizadas en la superficie de los agentes patógenos^[229]. Esto es de vital importancia para asignar factores de riesgo patológico a las

distintas variantes de la proteína.

4.9. ASPECTOS EVOLUTIVOS: EL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO EN RATON.

Por sus características especiales, merece mención especial el estudio del cuarto componente del complemento en ratón. Esta constituido por dos glicoproteínas de alta homología, cuyos genes se sitúan en el cromosoma 17 dentro de la región S^[230, 231] de su complejo de histocompatibilidad, H-2: C4, que ocupa el loci C4y (Ss), y SIp (proteína limitada por el sexo). En los extremos 3' de los genes de C4, al igual que en el hombre, se localizan los que codifican para la 21-OH-hidroxilasa^[232].

C4 murino es sintetizado como un precursor monocatenario^[233] posteriormente procesado a una molécula tricatenaria de 1719 aminoácidos^[234, 235]. Se han encontrado formas parcialmente procesadas β - α y α - γ ^[236] que se suponen precursoras de la estructura nativa que encierra el grupo tioéster funcional.

Slp, de 209 Kd, constituida por 1716 aminoácidos (tres menos que C4 por una delección cercana al punto de rotura por C1s)^[237], carece de actividad hemolítica^[238] a pesar de tener un enlace tioéster intacto^[236]. Presenta gran cantidad de carbohidratos en su cadena α , que ocasiona un aumento del peso molecular, 105 Kd, en relación al de C4, 98 Kd. Es expresada en machos de algunas cepas tras la inducción por testosterona, aunque se ha demostrado un control en hembras no ligado a la región H-2^[239]. Loreni et al.^[240] sitúan su región reguladora 2 Kb por delante del sitio de transcripción donde se encuentra insertado el provirus responsable de la respuesta a andrógenos^[241].

Un raro polimorfismo en el tamaño molecular caracteriza la cadena γ murina de C4, no dependiente de azúcares, pues esta subunidad carece de ellos^[242]. Además se han detectado cadenas γ con diferente punto isoeléctrico^[243].

La concentración plasmática varía en las distintas cepas^[244]. Una alteración a nivel de mRNA^[245, 246], confirmada por la localización en las cepas "low" de una inserción de 200 pb entre el exon 13 y el exon 14, permite procesamientos aberrantes por introducción de nuevos puntos de rotura^[247]. Esta regulación tiene un control tisular: en cultivos de macrófagos no se aprecian diferencias^[248]. Funcionalmente, Dieli et al. demostraron la preferencia por enlaces amida de las cepas "low" frente a los enlaces éster de las cepas "high"^[249]. Se han encontrado factores trans-reguladores no ligados al complejo H-2 que afectan a los niveles de C4 y SIp^[250].

De un interés especial son las cepas w7, w16 y w19:

- carecen de parte de las glicoproteínas (pérdida de oligosacáridos de tipo complejo^[251]), lo que les confiere una cadena α 2 Kd más ligera que las cepas salvajes, que

se correlaciona con una disminución en su actividad hemolítica^[252]. Esta variación se debe a la pérdida de la Asn que sería reconocida por la glicosiltransferasa para la unión covalente de los N-oligosacáridos^[253, 254]. Estas cepas, además, tienen alteraciones en la unión covalente a las superficies aceptoras^[255].

- expresan constitutivamente SIp. Algunos estudios han localizado tres o cuatro loci, algunos considerados híbridos C4/Slp, íntimamente relacionados con esta forma de expresión^[256, 257].

Por último, se ha designado un nuevo alotipo para C4 murino en la zona correspondiente al fragmento C4d, denominado C4d.2^[258], que se diferencia del tipo salvaje en el punto isoeléctrico, a causa de la sustitución de la Gln¹¹⁹¹ (C4d.1) por Arg (C4d.2), también polimórfica en el hombre^[259].

En cobaya se ha descrito un polimorfismo con la presencia de al menos tres alelos, C4S, C4S1 y C4F, en desequilibrio de ligamiento con factor B^[260].

En el **aspecto evolutivo**, el C es un sistema de activación en cascada presente en la sangre de todos los vertebrados. Una molécula con actividad C3, pero tricaténaria ha sido descrita en ciclóstomos (*Lampetra japonica*, *Eptatetrus burgeri*)^[261, 262] y es considerada el precursor de ambas especies moleculares, C3 y C4. Actividad C4 se conoce en los condriictios, y en anfibios, *Xenopus laevis*, se ha descubierto una molécula con características funcionales de C4 humano, pero que comparte múltiples homologías con C3^[263].

No todos los mamíferos duplican el gen de C4. En perro, gato^[264], rata y cobaya^[265] solamente ha sido posible detectar un locus; en ballenas también existe uno sólo^[266], pero su producto génico tiene reactividad intermedia entre C4A y C4B; en el carnero^[267], cerdo, ratón y en los primates, se encuentra duplicado. Estos datos indican que la duplicación es reciente e independiente en cada grupo, ya que dentro de los ungulados (carnero y cerdo) la disposición genética es diferente^[268].

Si comparamos las secuencias humana y murina, la homología intraespecie (96% a nivel de nucleótidos y 94% a nivel proteico^[237]) es mayor que la interespecie (79% a nivel de DNA y 76% a nivel de aminoácidos^[234]), confirmando que la duplicación es reciente, independiente y posterior a la separación de los distintos órdenes en los mamíferos^[270].

La cercanía filogénica con el chimpancé se argumenta por la existencia de la delección de 9 pb en el gen 21-OH-A y por la frecuencia de los haplotipos medio nulos (la duplicación es anterior a la diversificación de las dos ramas). Sin embargo, hay datos que parecen contradictorios: el orangutan, que carece de la delección, presenta el gen de C4A largo, sugiriendo una mayor proximidad al hombre. Esta estructura genética se explica por contracción y expansión de la región a través de sobrecruzamientos desiguales^[270].

En relación a cual de los dos genes, el largo o el corto, existirían previamente a la duplicación, las hipótesis son contrapuestas: algunos autores piensan, apoyados por la estructura genética del ratón y chimpancé, que la forma corta precede evolutivamente a la larga^[270, 271], mientras que otros defienden que el gen primordial sería largo^[272].

4.10. PATOLOGIA ASOCIADA A LAS DEFICIENCIAS ALELICAS DE C4.

La deficiencia completa, homocigotos C4A*Q0BQ*0, es rara y tan sólo dos decenas de casos han sido publicados. Sus manifestaciones clínicas son similares a las producidas por los déficits de otros componentes iniciales de la VC: síndromes "lupus eritematoso" (LES), *glomerulonefritis membranoproliferativa*, *púrpura anafilotoide* e *infecciones recurrentes*.

El haplotipo nulo C4AQ0 (frecuencia en poblaciones caucasoides 8.7-19.1%) se relaciona con una mayor susceptibilidad a enfermedades con depósito de inmunocomplejos, tipo LES, por el hecho de interaccionar preferentemente con ICs. La presencia C4B*Q0 (10.4-19.5%) se ha documentado como un factor negativo para la supervivencia^[274]. Las principales enfermedades asociadas con alelos nulos se listan en la tabla 1.6.

Tabla 1.6^[273].

<u>Enfermedades asociadas a los alelos nulos.</u>
Lupus eritematoso sistémico
Lupus eritematoso diseminado
Enfermedad de Sjögren
Deficiencia en IgA
Enfermedad de Graves
Diabetes dependiente de insulina
Hepatitis activa crónica
Púrpura de Schonlein-Henoch
Hematuria recurrente benigna
Penencefalitis esclerosante subaguda

Varios mecanismos destacan en la generación de haplotipos medio nulos en C4:

1. Las deleciones, ocasionadas por sobrecruzamientos desiguales en una región genética de alta homología, son responsables en el 50% de los casos^[105]. En la figura 4.20 se aprecia que como consecuencia del apareamiento no homólogo, una cromátida contiene un único gen (haplotipo medio nulo) y la otra, tres (duplicación). Hasta el momento, se han detectado deleciones de un fragmento de 28-30 Kb que incluye C4A y 21-OH-A, 21-OH-A y C4B, y el de C4B y 21-OH-B^[275].

Otro mecanismos suplementarios tienen que compensar la menor frecuencia de las duplicaciones en relación a los haplotipos nulos.

2. La conversión génica como origen de falsos haplotipos nulos. Por sobrecruzamientos intragénicos, un alelo

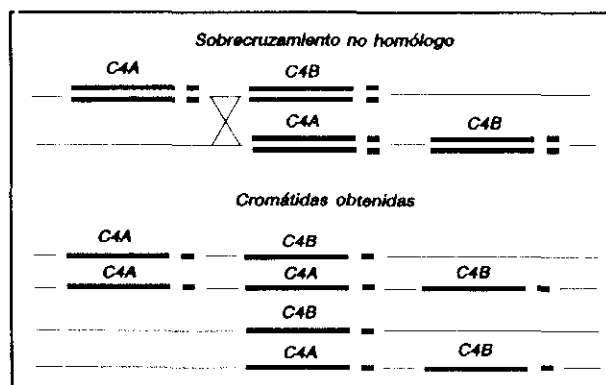


Figura 1.20. Generación de duplicaciones y deleciones por sobrecruzamiento no homólogo.

isotípico se transforma en uno del isotipo contrario. Entonces, un haplotipo C4A3A3BQ*0 se consideraría medio nulo por los procedimientos de tipaje habituales que sólo detectan la proteína C4A3^[276].

3. La presencia de pseudogenes: mutaciones o pequeñas deleciones que incorporan un marco de lectura anómalo o la aparición de un codón de terminación^[224].

4. Alteraciones en la transcripción o traducción completarían la posibilidad de fenotipos nulos.

Se ha publicado un déficit de C4 heredado de forma autosómica dominante y no ligado a HLA^[277].

En cuanto a la patogenia de las enfermedades asociadas a las deficiencias de C4, tres explicaciones parecen las más plausibles:

- ausencia o deficiencia de algún producto de C4.
- alteración de genes reguladores o no identificados en la región de clase III.
- descompensación de la acción coordinada de varios alelos (sinergismo en cis).

5. LAS INMUNOGLOBULINAS DE CONEJO.

Son proteínas de 150 Kd construídas por 4 cadenas, iguales dos a dos, unidas por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes. Sus cadenas pesadas (H), de 50 Kd, y las ligeras (L), de 25 Kd, constan, respectivamente, de cuatro y dos dominios de 110-120 aminoácidos con un bajo grado de variabilidad interespecífica, excepto en las regiones hipervariables de los segmentos N-terminales (V_H y V_L) que delimitan el sitio antígeno combinante. La mitad constante C-terminal de H ($C\gamma_2$ y $C\gamma_3$) se une al $C\gamma_1$ por la región bisagra, que permite una amplia movilidad molecular.

En el análisis por dispersión de rayos X muestra a cada dominio limitado por un puente disulfuro intracatenario, con una arquitectura molecular formada por 7 láminas β antiparalelas que construyen dos superficies enfrentadas (4 contra 3).

La composición en carbohidratos es similar a la IgG humana. El mayoritario lleva anclado 5 glucosaminas, 2 galactosas, 5 manosas, una fucosa y ácido siálico a la Asn²⁹⁷ (numeración Eu de la IgG1) de la región Fc. Un segundo grupo de azúcares (galactosamina-galactosa-2 ácidos siálicos), en el 40% de las moléculas, se une covalentemente a la Thr²²⁵ (alotipo d12) de la región bisagra, que es reemplazada por una Met en d11. Alrededor del 15% de las moléculas poseen otro tercer hidrato de carbono (glucosamina) de localización incierta.

Entre el 70-90% de las cadenas L de conejo pertenecen al tipo κ (controlado por el locus b), y el resto son λ (locus c). Se han descrito dos poblaciones κ , κ_A (cinco Cys) y κ_B (siete Cys con un enlace disulfuro adicional entre las Cys⁸⁰-Cys¹⁷¹). Otra característica peculiar de la IgG de conejo es que sus cadenas H se encuentran ligadas solamente por un puente disulfuro entre las Cys²²⁶, mientras que el enlace con L se realiza entre la Cys¹³¹(H)-Cys¹⁷²(L). Existen variaciones alotípicas tanto en L como en H. De gran interés para este trabajo, además de la mencionada en el residuo 215, es la sustitución de Thr³⁰⁹ (e14) por Ala (e15)^[278].

5.1. DIGESTIONES ENZIMATICAS.

El tratamiento de la IgG con **papaína** a 37°C y pH 7.0 produce la rotura del enlace Met²²⁵-Cys²²⁶ (Thr²²⁵-Cys²²⁶ en el alotipo d12, con menor porcentaje por la interferencia del azúcar), y tras incubación más prolongada, entre Cys²²⁰-Ser²²¹ y Ser²²¹-Lys²²², generando dos fragmentos F(ab), portadores del sitio antígeno combinante (constituido por L y región Fd -V_H y Cy1-), y dos regiones Fc (dominios Cy2 y Cy3), que se mantienen unidas por fuerzas no covalentes. Hidrólisis secundarias en los residuos 341 y 433, rinden un fragmento Fc' localizado en el Cy3.

La **pepsina**, en condiciones subóptimas, 24 h a 37°C a pH 4.2, rompe por debajo del disulfuro que une las dos mitades de la molécula en el enlace Leu²³⁴-Leu²³⁵ rindiendo el fragmento F(ab)₂, que engloba la cadena L y el Fd (el V_H, Cy1 y la región bisagra). La región Fc es degradada a un péptido de 24 Kd, dímero del Cy3 (pFc'), y multitud de oligopéptidos del dominio Cy2.

A pH neutro y previa exposición de la IgG a pH 2.5 para desestructurar las cadenas, la **plasmina**, hidroliza el enlace Lys³²⁶-Ala³²⁷ generando el F(acb), que corresponde a la molécula de IgG que ha perdido el Cy3.

Por último, conviene recordar que la IgG de conejo es resistente a la digestión con **tripsina**. Aunque tras su aminoetilación, escinde el enlace aminoetilCys²²¹-Ser²²².

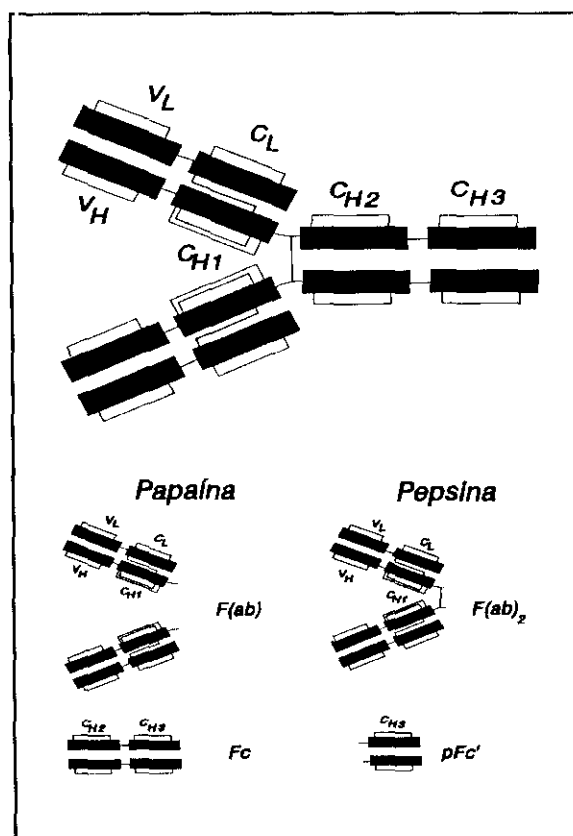


Figura 1.21. Estructura de la IgG de conejo. Fragmentos de digestión por papaína y pepsina.

6. INTERACCION COVALENTE ENTRE C4 Y SUPERFICIES ACEPTORAS. EL ESTADO DE LA CUESTION.

Ya en 1968, Chan, P.C.Y. & Cebra, J.J.^[279] encuentran por inmunodifusión doble radial, bandas de precipitación con suero anti-C4 en fragmentos Fab de ICs que habían activado la VC, pero no en el Fc. A partir de entonces, pocos intentos se han hecho para localizar el punto de interacción entre C4 y las moléculas aceptoras.

Experimentos que utilizaban ICs mixtos (parte completos y parte formados con F(ab')₂) sitúan, primero mediante pruebas funcionales (la unión de C4 es la misma en ICs normales que en los mixtos)^[280] y, posteriormente, por análisis electroforéticos la zona de interacción en el Fd^[281], y definen a la cadena α' de C4 como la responsable de la interacción, y al carbonilo del enlace tioéster como el grupo reactivo.

Una vez preestablecido el punto de interacción, y ante la dificultad de realizar mejores precisiones, los estudios se dirigen hacia la caracterización del tipo de enlace. Trabajando con eritrocitos de carnero como superficie aceptora, Isenman, D.E. & Young, J.R.^[197], mediante PAGE-SDS bidimensionales, con la segunda dimensión tras el tratamiento con NH₂OH, definen que C4A se une a través de enlaces amida, mientras que C4B, lo hace mediante ésteres.

En ensayos de activación de la VC "in vitro" por ICs precipitantes, Alcolea et al.^[282] confirman la interacción α' -H, sugieren la existencia de dos poblaciones de C4 en cuanto a sus propiedades de unión covalente a ICs (una formadora de amidas y otra de ésteres) e hipotetizan una interacción C4b-cadena L de la IgG. Cuando IgG soluble es incubada en presencia de C1 y C4^[195], una banda de alto peso molecular, marcada radiativamente tanto si se utiliza ¹²⁵I-IgG como ¹²⁵I-C4, es definida como complejos C4b-IgG. Cuando dicha banda es escindida del gel, y recargada en condiciones reductoras, dos bandas de 200 y 150 Kd se hacen patentes, sin que se precise su constitución.

Por último, inmunoagregados en fase sólida, formados anclando a placas de poliestireno NIP-BSA y depositando sobre ellas un AC monoclonal anti-NIP, detectan complejos entre C4 y el Ag^[283].

Cabe mencionar en este apartado, por su similitud, que durante la activación de la VA por IgG agregada por calor se forman complejos covalentes entre la cadena α' de C3b y un fragmento de 18 Kd de la IgG que engloba desde los últimos 20 residuos del V_H hasta los 20 primeros del Cy2^[284], recientemente acotado al Cy1^[285].

Datos aportados en nuestro laboratorio demuestran, incubando ICs con suero humano normal, unión de C3b al dominio Cy3^[286] y a la región bisagra^[287].

II.OBJETIVOS

II. OBJETIVOS.

Después de analizar los conocimientos sobre el tema, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Estudiar las reactividades de los dos isotipos de C4, C4A y C4B, en la activación de la VC "in vitro" por ICs OVA-antiOVA en el punto de máxima precipitación.

2. Tratar de diferenciar los complejos formados con ambos isotipos de C4.

3. Delimitar el/los dominio/s de unión covalente de C4 a la IgG de conejo en nuestro sistema de estudio, con objeto de establecer una base molecular para el asentamiento de las convertasas de la VC y la posible implicación en el desmembramiento de la malla de ICs en el proceso de inhibición de la inmunoprecipitación, ambas funciones implicadas en la patogenia de enfermedades autoinmunes.

Utilizamos un sistema "in vitro" heterólogo (inmunoagregados formados con IgG de conejo/componentes aislados del complemento humanos) por la dificultad de obtener IgG humana frente a un antígeno conocido en cantidad suficiente. Además la IgG de conejo es de fácil obtención por inmunizaciones seriadas y carece de isotipos, facilitando la interpretación de los resultados.

Se siguieron cuatro estrategias fundamentales:

- *geles de bajo entrecruzamiento y ensayos hemolíticos para detectar el isotipo de C4.*
- *incorporación de iodo[1-¹⁴C]-acetamida en la Cys liberada por rotura de un enlace tioéster tras la activación de C4 por C1s o ¹²⁵I-IgG para detectar y seguir los complejos covalentes.*
- *hidrólisis con NH₂OH de los enlaces formados en los distintos complejos, así como la secuenciación radioquímica de los péptidos liberados.*
- *digestiones enzimáticas (pepsina y tripsina) para definir los dominios de interacción.*

III.MATERIALES Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIALES.

1.1. PLASMA HUMANO.

Se obtuvo de individuos sanos en el banco de sangre de la Fundación Jiménez Díaz o de donantes voluntarios sanos tipados: C4A3BQ*0 para la obtención de C4A (I.D.) y C4AQ*0B1 para C4B (F.B.), almacenándose a -70°C hasta su utilización.

Para el aislamiento de los isotipos, plasma recién extraído o descongelado a 37°C se lleva a una concentración 10 mM en EDTA (Scharlau^R) y se clarifica en una ultracentrifuga Kontron^R a 75000 g durante 45 min para eliminar las lipoproteínas. Posteriormente se hacen alícuotas de 10 mL que se guardan a -80°C hasta la realización de los aislamientos.

1.2. ERITROCITOS DE CARNERO.

Se obtienen por extracción de la vena yugular de carneros sanos del animalario de la Fundación Jiménez Díaz por medio de frascos cerrados al vacío conteniendo heparina como anticoagulante y se guardan en la cámara fría a 4°C hasta que son utilizados.

1.3. HEMOLISINA DE CONEJO.

La hemolisina se obtiene por inmunización de conejos "New Zealand", pertenecientes al animalario de la Fundación Jiménez Díaz, con eritrocitos de carnero.

Los eritrocitos son lavados con PBS hasta que el sobrenadante queda transparente. 2.5 mL de dichos eritrocitos se llevan a 50 mL con el tampón anterior (hematíes al 5%). Se inyecta 1 mL en la vena central de la oreja con la siguiente pauta: inmunizaciones cada dos días durante las dos primeras semanas, para posteriormente realizar reinmunizaciones cada 10 días; al cabo de dos meses se realiza la primera sangría y a partir de entonces se siguen ciclos mensuales de reinmunización el día 20 y sangría el día 30.

La sangría se efectúa mediante un corte oblicuo y limpio en la vena marginal de la oreja, obteniéndose 35-50 mL de sangre que se incuban a 37°C durante 1 h y a 4°C toda la noche. Se retira el coágulo por centrifugación y el suero se calienta a 56°C durante 1 h para inactivar el complemento. El producto resultante es la hemolisina que se almacena a 4°C.

2. AISLAMIENTOS DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEMENTO.

2.1. AISLAMIENTO DEL PRIMER COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C1).

Se realiza siguiendo el método de I. Gigli et al.^[3]. Partimos de 1 L de plasma humano que se hace 20 mM en CaCl_2 (Merck^R) para incubarse seguidamente 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifuga a 15300 g en una centrífuga J-21 de Beckman^R para separar el suero del coágulo. Se añaden 2 mL de Dip-F (Sigma^R) 2.5 M - un inhibidor de serinproteasas -, diluido en isopropanol (Scharlau^R) desecado con NaSO_4 (Merck^R). Este suero es el material de partida para el aislamiento que consta de las siguientes etapas:

- clarificación del suero.
- precipitación de euglobulinas.
- *separación de lipoproteínas del suero.*
- filtración en gel.

- **clarificación del suero** .- se realiza una centrifugación a 23000 g durante 30 minutos a 4°C en una ultracentrífuga L8-70 de Beckman^R.

- **precipitación de euglobulinas** .- el sobrenadante anterior se mezcla con 4 L de agua destilada conteniendo 5 mM de CaCl_2 (Merck^R), 2.5 mM de idoacetamida (Sigma^R; inhibe las enzimas séricas con grupos catalíticos SH) y 0.2 mM de fenantrolina (Sigma^R; inhibidor de metaloproteínas). A la mezcla se añade 1 mL de Dip-F y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH (Merck^R). Se somete a agitación continuada durante 2 h a 4°C, y luego, se centrifuga a 23000 g durante 30 min a 4°C para obtener la fracción euglobulínica (precipitado).

- **separación de lipoproteínas del suero** .- el precipitado se resuspende en un volumen aproximado de 100 mL de tampón acetato sódico 50 mM pH 5.5 conteniendo 5 mM de CaCl_2 . Se centrifuga a 12500 g durante 45 min a 4°C. El nuevo precipitado se resuspende en tampón acetato sódico 50 mM pH 5.5 conteniendo 5 mM de CaCl_2 y 0.2 M NaCl al que se vuelve a añadir 1 mL de Dip-F. Se centrifuga a 75000 g durante 30 minutos a 4°C para eliminar la película lipídica que se forma en la superficie.

- **filtración en gel** .- tras la eliminación de la capa de lípidos, el sobrenadante del paso anterior, aproximadamente 30 mL, se carga en una columna de 5 x 90 cm de Sepharosa CL 6B (Pharmacia^R) equilibrada en el tampón anterior. Se eluye la columna con un flujo de 40 mL/h, recogiendo fracciones de 5.5 mL. Las que resultan positivas para C1 son mezcladas y concentradas mediante un sistema Amicon^R hasta alcanzar una A_{280} entre 1.1-1.5. C1 se almacena en tubos de 10 mL a -70°C hasta su utilización.

2.2. AISLAMIENTO DEL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C4).

2.2.1. Método de Lundwall et al.^[288]

Partimos de 1200 mL de plasma que se descongelan en un baño a 37°C mientras se añaden lentamente 120 μ L de Dip-F 2.5 M resuspendido en isopropanol anhidro. Para clarificar el plasma, se centrifuga a 15000 g durante 25 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman^R J2-21. El sobrenadante es sometido a los siguientes pasos:

- cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex A-50 (Pharmacia^R).
- cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa (Pharmacia^R).
- filtración en gel en Sephadex G-200 (Pharmacia^R).

- **cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex A-50** .- Al plasma clarificado se le añaden 180 mL de resina equilibrada en tampón TRIS (Sigma^R)-HCl 20 mM pH 7.0 conteniendo NaCl 0.11 M y EDTA 2 mM. Se agita lentamente en "batch" a 4°C durante al menos 2 horas. Decantamos y eliminamos el sobrenadante. Con el precipitado se rellena una columna de 5 x 30 cm que se lava con el mismo tampón de equilibrado a un flujo de 100 mL/h hasta que la A_{280} es inferior a 0.1 unidades.

En este punto, se incrementa la fuerza iónica del tampón de lavado (TRIS-HCl 20 mM pH 7.0 conteniendo NaCl 0.2 M y EDTA 2 mM) manteniendo el mismo flujo hasta que la A_{280} desciende, de nuevo, por debajo de 0.1. En este paso salen excluidos C3 y C5.

Posteriormente, la columna se eluye aumentando nuevamente la fuerza iónica del tampón (TRIS-HCl 20 mM conteniendo NaCl 0.5 M y EDTA 2 mM) recogiendo fracciones de 7.0 mL. Las que resultan positivas para C4, por inmunodifusión doble radial, son mezcladas y suplementadas con 10 μ L de Dip-F 2.5 M por cada 100 mL de eluido. Este se concentra en un sistema Amicon^R hasta 300 mL aproximadamente.

- **cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa (DE-32)** .- el concentrado resultante del primer paso cromatográfico se dializa intensivamente frente al tampón TRIS-HCl 20 mM pH 8.0 conteniendo NaCl 60 mM hasta que la conductividad es inferior a 6 mS. Se carga en una columna de 5 x 22 cm de DEAE-Celulosa equilibrada en el tampón anterior. Dicha columna se lava a un flujo de 60 mL/h hasta que la A_{280} es inferior a 0.08. Entonces, se eluye con un gradiente lineal de 4 L elevando la fuerza iónica del segundo tampón hasta 250 mM en NaCl, colectándose fracciones de 7.3 mL. Las que resultan hemolíticamente activas se mezclan, se suplementan con 10 μ L de Dip-F 2.5 M por cada 100 mL de eluido, concentrándose hasta 30 mL en un sistema Amicon^R.

- **filtración en gel** .- como último paso, el concentrado se carga en una columna de 5 x 90 cm de Sephadex G-200 (en alguna ocasión se sustituyó por una Sepharosa CL 6B con

resultados similares) equilibrada en tampón fosfato sódico (Merck[®]) 20 mM pH 7.4 conteniendo NaCl 0.15 M. Se eluye a un flujo de 30 mL/h recogiendo fracciones de 4.5 mL.

Las fracciones positivas para C4 con alto grado de pureza por PAGE-SDS son concentradas en ampolla de vacío hasta alcanzar un valor entre 1.0-1.3 mg/mL, considerando que $E^{0.15}_{280}$ para C4 es 0.86 mL/(mg x cm)^[25] y almacenadas a -70°C hasta su utilización.

notas: (1) Todas las cromatografías se realizan en cámara fría a 4°C.

(2) Todos los tampones van suplementados con Dip-F.

2.2.2. Repurificación de C4 por FPLC.

Descongelamos 1 mL de C4 del aislamiento anterior a 37°C y lo diluimos, para evitar la precipitación de la proteína, hasta 3 mL en tampón acetato sódico (Merck[®]) 20 mM pH 4.5 conteniendo 0.2 M NaCl. Tras intensiva diálisis frente al mismo tampón, se carga mediante un superloop de 10 mL (Pharmacia[®]) en una columna de intercambio iónico Mono S HR 5/5R (Pharmacia[®]) en un sistema FPLC con los siguientes solventes:

- tampón A: acetato sódico 20 mM pH 4.5 conteniendo NaCl 0.2 M.
- tampón B: acetato sódico 20 mM pH 4.5 conteniendo NaCl 0.8 M.

La columna se lava con el tampón A durante 15 min a un flujo de 1 mL/min para eluirse, posteriormente, con un gradiente lineal desde 0 a 100% de tampón B en 24 min. Se mantiene a 100% del mismo tampón 2 min más, retornándose a las condiciones de equilibrio en 1 min. Durante toda la cromatografía se colectan fracciones de 0.4 mL y las positivas para C4, por PAGE-SDS, se mezclan y concentran en ampolla de vacío hasta 0.9-1.2 mg/mL.

2.2.3. Por inmunoabsorbente policlonal.

a/ Inmunización y purificación de la fracción γ y de la IgG anti-C4 de conejo.

- *Pauta de inmunización* .- 100 μ g de C4 repurificados por FPLC en un volumen aproximado de 100 μ L son mezclados con 150 μ L de adyuvante completo de Freud (Difco[®]), agitados intensamente hasta formar una emulsión uniforme e inyectados por vía intramuscular a conejos "New Zealand" siguiendo la misma pauta que se expone en III.3.1. para la IgG antiOVA.

La obtención del antisuero, la precipitación de la fracción γ y la obtención de IgG anti-C4 en una columna de intercambio iónico se detallarán en el punto III.3.2. con ocasión de la purificación de la IgG antiOVA.

b/ Acoplamiento a Sepharosa 4B activada con CNBr.

Se resuspenden 3 g de Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia[®]) en 15 mL de HCl 1 mM. Una vez hidratada, se lava en un embudo perforado durante 15 min con la misma solución. Se dializan 50 mg de IgG anti-C4 frente al tampón de acoplamiento (bicarbonato sódico -Merck[®]- 0.1 M pH 8.3 conteniendo NaCl 0.5 M) y se mezcla con el gel. Durante toda la noche se agita a 4°C en una rueda giratoria. A la mañana siguiente, el exceso de ligando se lava con el tampón anterior y se lee la A_{280} , aplicando un $E^{0.1\%}_{280}$ para la IgG de 1.4 mL/(mg x cm) para cuantificar el grado de acoplamiento que resultó ser del 97%. Los grupos que permanecen libres se bloquean con etanolamina 1 M pH 9.0 durante toda la noche a 4°C y el producto resultante es sometido a tres ciclos alternativos, consistiendo cada ciclo en un lavado con tampón acetato sódico 0.1 M pH 4.0 conteniendo NaCl 0.5 M seguido de TRIS 0.1 M pH 8.0 conteniendo NaCl 0.5 M. Luego, se monta el inmunoabsorbente en una jeringa de 10 mL y se equilibra en el tampón del aislamiento, conservándose a 4°C.

c/ Aislamiento de C4AB (C4A3 o C4B1 a partir de plasma monoisotípico).

Se cargan 30 mL de plasma-EDTA (ocasionalmente 10 mL de plasma-EDTA del donante I.D.- C4A3BQ0 - para el aislamiento de C4A3 o de F.B. - C4AQ0B1 - para el de C4B1) en el inmunoabsorbente policlonal anti-C4 equilibrado en tampón TRIS 100 mM, fosfato sódico 100 mM, tetraborato sódico (Merck[®]) 25 mM y EDTA 5 mM ajustándose el pH de la mezcla a 7.0 con HCl (Scharlau[®]). Intensamente se lava la columna a un flujo de 30 mL/h hasta que la A_{280} es inferior a 0.02, eluyéndose en el mismo tampón por elevación del pH a 11.25^[289]. Se colectan fracciones de 2 mL y las que contienen proteína, detectada por A_{280} se mezclan.

Su concentración se lleva a cabo en una columna de intercambio iónico DEAE-Sepharcel (Pharmacia[®]) equilibrada en tampón fosfato sódico 25 mM pH 7.5 conteniendo NaCl 25 mM y EDTA 0.5 mM. La elución se efectúa a 30 mL/h por aumento de la fuerza iónica a 0.5 M en NaCl. Se colectan fracciones de 0.5 mL en dos grupos diferentes: el primero, contiene aquellas cuya A_{280} es mayor de 0.3 (son las que se utilizarán en los ensayos de interacción), y el segundo, las que se encuentran entre 0.075-0.3 (se dializarán frente al tampón de equilibrado y volverán a cargarse en la misma columna junto con las procedentes de otros aislamientos).

2.2.4. Por inmunoabsorbente monoclonal L003 (aislamiento de isotipos).**a/ Obtención de IgG1 a partir de ascitis de ratón.**

El AC monoclonal anti-C4 (especificidad anti-Chido^[170,174]), L003, capaz de separar los dos isotipos de C4^[213], es suministrado por los laboratorios de la Commonwealth en Australia. 450 μ L de ascitis de ratón se diluyen con 500 μ L de tampón fosfato sódico 0.1 M

pH 8.0 y 20 μL de TRIS 1 M pH 8.0 cargándose en una jeringa de 5 mL que contiene Sepharosa 4B Proteína A (Pharmacia^R) previamente depurada con ácido cítrico (Merck^R) 0.1 M y equilibrada en el tampón de carga. Con el mismo tampón, se lava a un flujo de 15 mL/h hasta que la A_{280} es inferior a 0.02. La elución se realiza con citrato sódico (Merck^R) 0.1 M pH 6.0, por tratarse de IgG1 (IgG2a eluye a pH 4.5 y la IgG2b a 3.5). Las fracciones de 1 mL colectadas que presentan una A_{280} mayor que 0.05 son mezcladas y concentradas en ampolla de vacío hasta que A_{280} es aproximadamente 0.5.

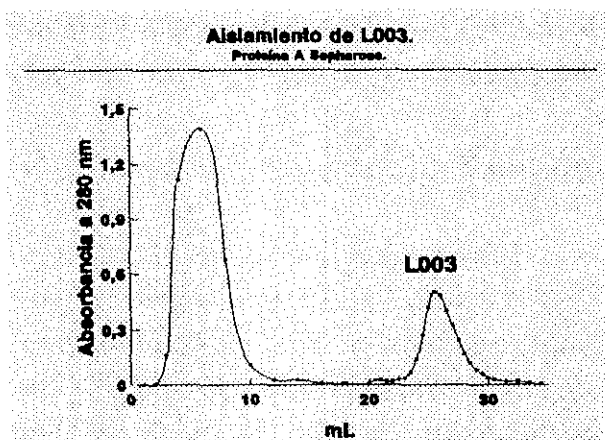


Figura 3.1. Aislamiento del monoclonal L003 en Proteína A Sepharosa.

b/ Acoplamiento a Sepharosa 4B activada con CNBr.

Se resuspenden 1.5 g de Sepharosa 4B activada con CNBr en HCl 1 mM y una vez hidratada se lava durante 15 min con la misma solución. Se añaden 5.5 g del AC monoclonal en un volumen de 8.4 mL, que habían sido dializados frente al tampón de acoplamiento (bicarbonato sódico 0.1 M pH 8.3 conteniendo NaCl 0.5 M). A continuación, se sigue el mismo protocolo detallado en el punto III.2.2.3.b. La columna se almacena a 4°C en PBS conteniendo 0.02% de azida sódica (Merck^R) hasta su utilización.

c/ Aislamiento de los isotipos de C4.

El inmunoadsorbente monoclonal L003 se monta en jeringa de 5 mL que se equilibra en un tampón TRIS 50 mM, fosfato sódico 50 mM, tetraborato sódico 12.5 mM, EDTA 2.5 mM y azida sódica 0.02%, según el método de Dodds A.W. et al.^[213], ajustándose el pH a 7.0 con HCl. Se carga con 15 mL de plasma-EDTA a un flujo de 25 mL/h, lavándose con el tampón de equilibrado durante 40 min a un flujo de 60 mL/h hasta alcanzar una A_{280} inferior a 0.04. Eluimos al mismo flujo con tampón TRIS 100 mM, fosfato sódico 100 mM, tetraborato sódico 25 mM y EDTA 5mM, aplicando un gradiente lineal de pH desde 8.5 a 11.5 en 40 ml, colectando fracciones de 1 mL. Las fracciones que contienen C4B por geles de bajo entrecruzamiento (III.6.3.2), procedentes de varios aislamientos, se mezclan y concentran a 4°C en ampolla de vacío hasta que la A_{280} se encuentra entre 1-1.2. Las fracciones positivas para C4A no serán utilizadas porque se obtiene con un rendimiento muy bajo.

3. FORMACION DE INMUNOCOMPLEJOS OVOALBUMINA(OVA)-ANTIOVOALBUMINA(anti-OVA).

3.1. OBTENCION DEL SUERO ANTIOVOALBUMINA: PAUTA DE INMUNIZACION.

Conejos de la raza "New Zealand" pertenecientes al animalario de la Fundación Jiménez Díaz se inmunizan con el antígeno: 100 μg de OVA (Sigma[®]), a una concentración de 1 mg/mL, se añaden a 150 μL de coadyuvante completo de Freud. Se agitan en vórtex hasta que la emulsión formada sea uniforme. La inmunización se efectúa por vía intramuscular, alternando la pata receptora, con inyecciones semanales durante 6 semanas, para posteriormente alternar sangrías y reinmunizaciones, también con una cadencia semanal.

3.2. PURIFICACION DE LA FRACCION γ Y OBTENCION DE IgG ANTI-OVA.

Realizamos la sangría en la vena marginal de la oreja mediante un corte oblicuo y limpio después de una ligera aplicación de xilol en su dorso para provocar vasodilatación local. Se recogen entre 40-50 mL de sangre que se incuban 1 h a 37 °C y 18 h a 4°C. El coágulo es eliminado por centrifugación, obteniéndose 25 mL de suero anti-OVA en el sobrenadante que son diluïdos hasta 75 mL en PBS. Se precipita la inmunoglobulina añadiendo el mismo volumen (75 mL) de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck[®]) 4 M. Tras incubar 1 h a 37°C y 18 h a 4°C, se centrifuga a 7520 g durante 30 min en una centrífuga J2-21 de Beckman[®]. Eliminado el sobrenadante, el pellet se resuspende en tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.6, resultando la fracción γ .

La obtención de IgG anti-OVA se completa en una columna de intercambio iónico Cellex D (Bio Rad[®]) de 3 x 15 cm previamente lavada con NaCl 1 M para eliminar restos contaminantes. Tras su equilibrado en tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.6, se carga la fracción γ intensamente dializada, eluyéndose la columna con el mismo tampón a un flujo de 40 mL/h. Las fracciones colectadas, de 7 mL, se mezclan y concentran en ampolla de vacío hasta una concentración entre 10-15 mg/mL utilizando un $E^{0.1\%}_{280} = 1.4 \text{ mL}/(\text{mg} \times \text{cm})$. El suero anti-OVA se almacena a -20°C hasta su utilización.

3.3. FORMACION DE INMUNOCOMPLEJOS. CURVA DE PRECIPITINAS.

Se prepara una solución de OVA a una concentración de 1 mg/mL. A partir de ella, se hacen diluciones seriadas del Ag conteniendo 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150, 200 y 300 μg , que se añaden a 100 μL del suero anti-OVA (18.6 mg/mL) completando un volumen final de 450 μL con tampón TRIS-HCl 0.01 M pH 7.4 conteniendo NaCl 0.15 M. Las muestras se incuban 1 h a 37°C y se dejan en la cámara fría a 4°C durante 48 h más. Trascurrido ese tiempo, se centrifugan 15 min a 11000 rpm en una Biofuga B de Heraeus[®] eliminándose el sobrenadante. Se lavan con el mismo tampón dos veces y los precipitados se almacenan a 4°C resuspendidos en 200 μL . Dos ensayos se solubilizan en 1 mL de NaOH

se almacenan a 4°C resuspendidos en 200 µL. Dos ensayos se solubilizan en 1 mL de NaOH 0.1 M cuantificándose mediante lectura espectrofotométrica a 280 nm.

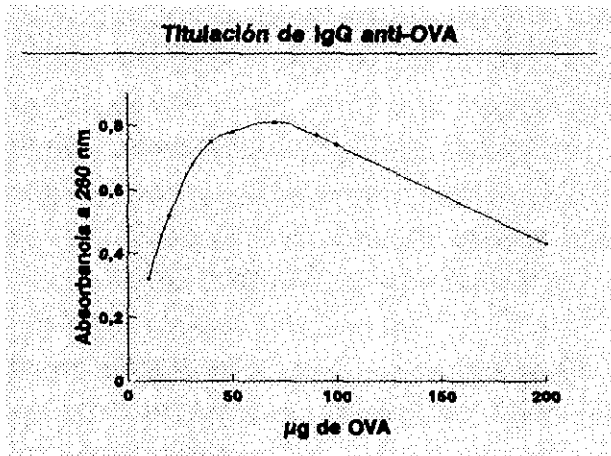


Figura 3.1. Titulación de IgG. Curva de precipitinas.

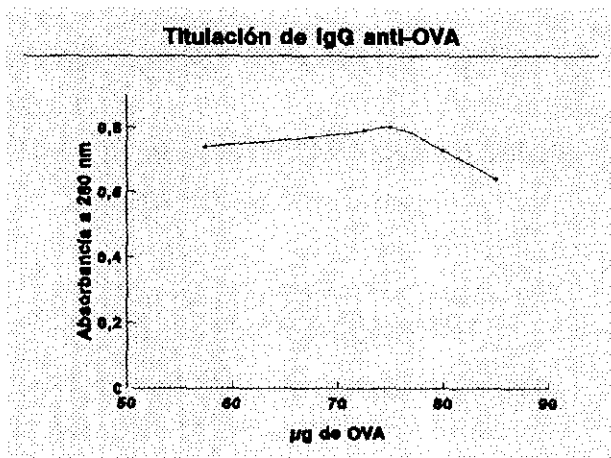


Figura 3.2 Titulación de IgG. Curva fina de precipitinas.

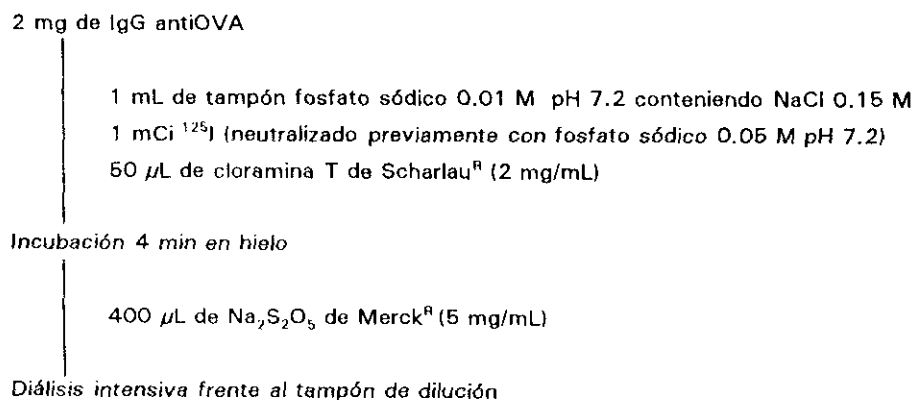
Con los datos obtenidos se dibuja la curva de precipitinas (figura 3.1). El intervalo comprendido entre los valores de máxima precipitación se utiliza para repetir de una forma más fina la curva (figura 3.2).

Los IC utilizados en los ensayos de interacción, como activadores de la VC del complemento, se forman en el punto de máxima precipitación. La relación añadida en el ensayo OVA:antiOVA está entre 1:48 y 1:53 (p/p), mientras que la razón tras la precipitación desciende a 1:10-1:15.

4. MARCAJE RADIOQUIMICO DE LA IgG CON ¹²⁵I.

La incorporación de ¹²⁵I (Amershan^R) a la IgG antiOVA se realiza por el método de la cloramina T ^[290] descrito por Campbell et al. y expuesto brevemente en el esquema 3.1.

Esquema 3.1. Marcaje de IgG con ¹²⁵I.



Se consigue una actividad específica alrededor de 400000 cpm/µg.

5. ENSAYOS DE INTERACCION ENTRE C1, C4 E IC OVA-ANTIOVA.

El procedimiento utilizado, para la activación de C1 por ICs y posterior pegada de C4, es una modificación del descrito en nuestro laboratorio por Alcolea, J.M. et al.^[282].

a/ material radiactivo: iodo[1-¹⁴C]acetamida (Amershan[®]). 250 μ Ci se resuspenden en 1 mL de agua destilada lo que supone una concentración de 0.79 mg/mL.

b/ los inmunocomplejos son obtenidos en el punto de máxima precipitación según se explica en el apartado III.3.3.

c/ componentes del complemento: las muestras de C1 (III.2.1) y de C4 (III.2.2) que van a utilizarse en el ensayo, se dializan frente a 400 mL de tampón TRIS-HCl 0.01 M pH 7.4 conteniendo 0.15 M de NaCl durante toda la noche y se preincuban 5 min a 37°C antes de incorporarse al experimento.

- d/ tampones:*
- (A) TRIS-HCl 0.01 M pH 7.4 conteniendo NaCl 0.15 M y CaCl₂ 0.002 M.
 - (B) TRIS-HCl 0.05 M pH 10.0 conteniendo NaCl 0.7 M y EDTA 0.02 M.
 - (C) PBS.

El marcaje de C4 con iodo[1-¹⁴C]acetamida se realiza en la Cys del tioéster que queda liberada tras la rotura proteolítica por C1s.

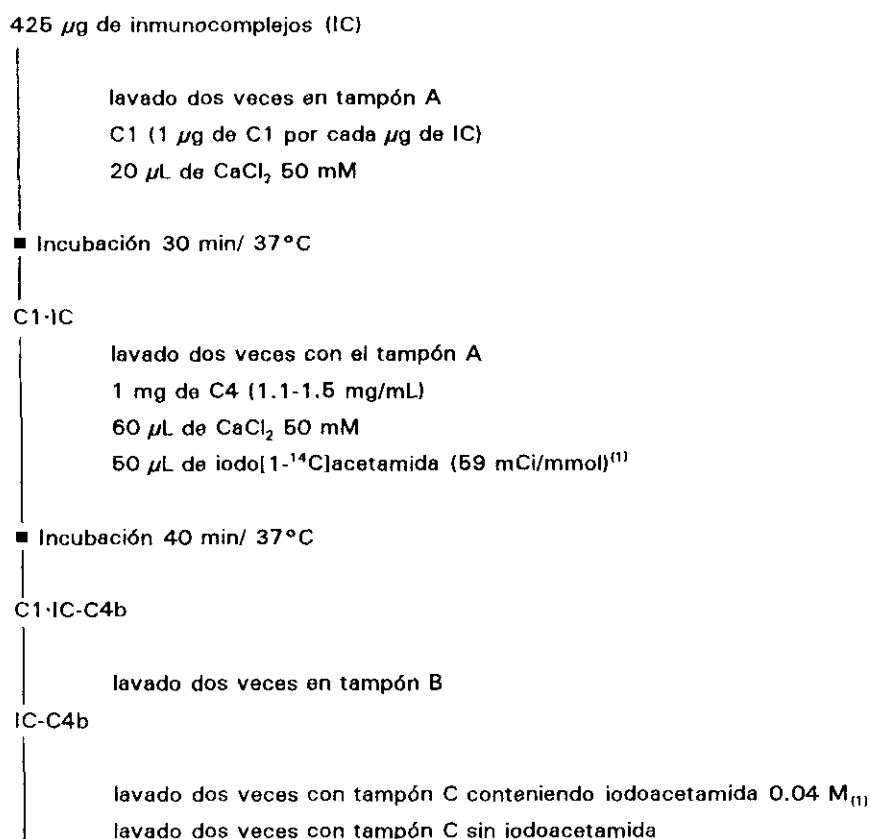
El desarrollo de los ensayos se muestra en el esquema 3.2.

6. METODOS DE DETECCION Y CUANTIFICACION.

6.1. ENSAYO HEMOLITICO: BREVE INTRODUCCION TEORICA.

Los ensayos hemolíticos^[291] de los componentes del complemento se basan en la hipótesis del "ONE HIT" descrita por M. M. Mayer. Esta teoría establece que un único sitio sobre la superficie de los eritrocitos, que reaccionan con su AC específico y activan la cascada del complemento, es capaz de producir la rotura del hematíe provocando la salida de hemoglobina al exterior de la célula, lo que sirve como método de cuantificación de la lisis.

La base teórica es la aleatoriedad del proceso en todas y cada una de las etapas previas a la lisis, dicho de otra manera, una molécula unida al hematíe no tiene efecto sobre la reactividad de cualquier otra. Observamos que este supuesto teórico se ajusta a una distribución de Poisson (los eritrocitos se lisarán por la existencia en su membrana de una o

Esquema 3.2. Ensayo de interacción entre C4 y los inmunocomplejos OVA-antiOVA.


⁽¹⁾ Solamente se añaden en el caso del marcaje radioquímico de C4 y no en los ensayos que se realizan con IgG marcada con ¹²⁵I.

más lesiones).

El grado de hemólisis (y), siguiendo dicha distribución, puede expresarse algebraicamente como:

$$y = 1 - e^{-z} \quad (1)$$

donde z es el número promedio de lesiones por célula; e la base de logaritmos naturales.

Tomando logaritmos neperianos en la ecuación (1), obtenemos

$$-\ln (1-y) = z \quad (2)$$

de donde se puede deducir fácilmente que para un valor de $z = 1$ (una lesión por célula de promedio), el porcentaje de células lisadas es del 63.2%.

6.1.1. Preparación de eritrocitos de carnero sensibilizados.

Se lavan 5 mL de eritrocitos de carnero (III.1.2) con PBS hasta que el sobrenadante queda transparente, dando un último lavado con tampón barbital sódico (Fluka[®]) 4.94 mM pH

7.35 conteniendo NaCl 142 mM, 0.1 % de gelatina de Scharlau^R (p/v), CaCl₂ 0.3 mM y MgCl₂ (Merck^R) 1 mM (GVB²⁺). Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm en una Omnifuga 2 RS de Heraeus^R.

20 mL de una suspensión de eritrocitos al 0.8% (añadiendo 49.6 mL de GVB²⁺ a 400 μ L de eritrocitos lavados y centrifugados) se diluyen con 19.96 mL de GVB²⁺, incubándose con 40 μ L de hemolisina (III.1.3), a una dilución 1:5120, durante 30 min a 37°C. Esta es la preparación de eritrocitos sensibilizados (EA), que contiene aproximadamente 1.2×10^8 hematíes/mL contabilizados en una cámara Neubauer (Brand^R).

6.1.2. Ensayo hemolítico de la fracciones cromatográficas.

Las muestras se preparan de la siguiente manera: una alícuota de cada fracción cromatográfica a ensayar se diluye 1:1000 en tampón GVB²⁺. 10 μ L de cada dilución se agregan a 0.5 mL de tampón GVB²⁺, 0.4 mL de EA y 0.1 mL (dilución 1:60) de suero cobaya deficiente en C4 (C4D) suministrado por Sigma^R.

Como controles se preparan los siguientes tubos duplicados:

Fondo: 0.5 mL de GVB²⁺, 0.4 mL de EA y 0.1 mL C4D (1:60).

Hemolisis espontánea: 0.6 mL de GVB²⁺ y 0.4 mL de EA.

Hemolisis total: 0.4 mL de EA y 2.6 mL de agua destilada.

Todas las preparaciones se incuban 10 min a 37°C. La reacción se para añadiendo 2 mL de PBS frío, centrifugándose a 3000 rpm durante 5 min en una omnifuga 2 RS de Heraeus^R. La absorbancia del sobrenadante se lee espectrofotométricamente a 414 nm (longitud de onda de máxima absorción de la hemoglobina).

6.1.3. Determinación del número de moléculas activas de C4.

Se toman 0.25 mL de distintas diluciones de los isotipos de C4, C4A y C4B, comprendidas entre 1:10³ y 1:10⁶, que se añaden a 0.25 mL de EA y 0.25 mL de C4D, como fuente de complemento, diluido 1:60. Se incuban 1 h a 37°C. El ensayo se para adicionando 2.5 mL de PBS frío. Los tubos se centrifugan 5 min a 3000 rpm en una omnifuga 2 RS de Heraeus^R a 4°C. La absorbancia del sobrenadante se lee espectrofotométricamente a 414nm.

Como controles se emplearon las siguientes muestras duplicadas que se trataron de igual forma que los tubos conteniendo la proteína problema:

Fondo: 0.25 mL de GVB²⁺, 0.25 mL de EA y 0.25 mL de C4D (1:60).

Hemolisis espontánea: 0.5 mL de GVB²⁺ y 0.25 mL de EA.

Hemolisis total: 0.25 mL de EA y 3 mL de agua destilada.

El número de moléculas activas se calcula aplicando la fórmula (2). Se representa

gráficamente z (número promedio de lesiones celulares) frente a los ng de C4. Interpolamos, en la gráfica, el valor $z = 1$, para obtener en el eje de abscisas la cantidad de C4 correspondiente al número de eritrocitos utilizados en el ensayo según la teoría del "ONE HIT" anteriormente expuesta.

Similarmente se estudia el número de moléculas hemolíticamente activas para las muestras de C4AB procedentes de los aislamientos.

6.2. INMUNODIFUSION DOBLE RADIAL.

El método fue descrito por Ouchterlony^[292]. Se prepara agar al 1 % en PBS a 37°C y con agitación suave para evitar la formación de grumos. De esta solución se añaden 5 mL a placas de Petri de 5 cm de diámetro que se dejan enfriar. Se almacenan a temperatura ambiente en un higrostat hasta su utilización.

Sobre estas placas se hacen orificios de 5 mm de diámetro (uno central y seis formando un hexágono a su alrededor aproximadamente a 1 cm de distancia). En el pocillo central se cargan 40 μ L de suero anti-C4 (Behring^R) u obtenido por inmunización de conejos con C4 aislado previamente (III.2.2.3.a), y en el resto, alícuotas de las fracciones cromatográficas que se desea ensayar. Se incuban a temperatura ambiente en un higrostat durante 16-40 h, observándose las bandas de precipitación bajo una lámpara sobre fondo oscuro.

6.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS Y DETECCION RADIOGRAFICA.

6.3.1. Método de Laemmli.

Este método, ya clásico, fue descrito por Laemmli en 1970 estudiando las proteínas de la cabeza del bacteriófago T4^[293].

A/PREPARACION DE LOS GELES.

Solución madre de acrilamida/bis-acrilamida (A): acrilamida (Bio Rad^R) al 30%, N-N'-metilen-Bis-acrilamida (Bio Rad^R) al 0.8% en agua desionizada.

Tampones y soluciones empleados:

- en gel de concentración (B): TRIS 1 M pH 6.8.
- en gel de resolución (C): TRIS 1 M pH 8.8.
- SDS (Bio Rad^R) al 10% (D).
- tampón de resuspensión de la muestra (E): TRIS 1 M pH 6.8 conteniendo 10% de glicerol (Panreac^R) y 2% de SDS.
- tampón de desarrollo de la electroforesis (F): TRIS 25 mM pH aproximadamente 8.3

conteniendo Gly (Bio Rad[®]) 192 mM y SDS 1%.

- persulfato amónico (Bio Rad[®]) 0.1 g/mL (G).
- N-N'-N'-metil-etilen-diamina (TEMED-Bio Rad[®]) (H).

Los volúmenes utilizados en la preparación de los geles aparecen en las tablas siguientes:

Tabla 3.1. Volúmenes del gel de concentración al 5%.

A(mL)	B(mL)	D(μ L)	G(μ L)	H(μ L)	agua(mL)	VT
1.7	1.25	100	50	5	7	10

Tabla 3.2 Volúmenes de los geles de resolución.

A (mL)	C (mL)	D (μ L)	G (μ L)	H (μ L)	agua(mL)	VT	% f
5.8	13.0	350	116.5	23.3	15.8	35	5
8.7	13.0	350	116.5	23.3	12.9	35	7.5
11.65	13.0	350	116.5	23.3	8.5	35	10

Tabla 3.3. Volúmenes del gel en resolución en gradiente del 6 al 18%.

A (mL)	C (mL)	D (μ L)	G (μ L)	H (μ L)	agua(mL)	VT	%
3.2	6.0	160	58.2	11.6	6.7	16	6
9.6	6.0	160	58.2	11.6	0.3	16	18

Los geles se polimerizan sobre placas de 16 cm formando con un peine de metacrilato 10 ó 15 pocillos donde se depositan las muestras.

B/ PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

A 50 μ L de muestra se le añaden 50 μ L de E conteniendo 5 μ L del agente reductor 2-mercaptoetanol (Sigma[®]) y 3 μ L de azul de bromofenol (Merck[®]) como indicador del frente de la electroforesis. Las mezclas se hierven durante 5 min.

C/ DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS.

Las muestras se depositan en los pocillos, dejando al menos dos de ellos para cargar patrones de peso molecular (miosina, 200 Kd; β -galactosidasa de *E. coli*, 116,25; fosforilasa B de músculo de conejo, 97,4; BSA, 66,2; OVA, 45; anhidrasa carbónica bovina, 31; inhibidor de la tripsina, 21,5; lisozima de huevo, 14,4; Bio-Rad[®]), resuspendidos en tampón

E conteniendo 5 μ L de 2-mercaptoetanol y 3 μ L de azul de bromofenol. Se aplica una corriente continua de 25 mA hasta que el azul de bromofenol rebasa el gel de resolución (75 min); entonces, elevamos el amperaje a 40 mA, dándose por terminada la electroforesis cuando el indicador alcanza el final de la placa (2 h 30 min).

D/ FIJACION Y TINCION DE LAS MUESTRAS.

Una vez desarrollada la electroforesis, el gel es sumergido durante 3-4 h en la solución de fijación (100:70:12; agua:metanol (Normasolv[®]):ácido acético de Scharlau[®]) que contiene 0.15% p/v de azul Coomassie brillante R-250 (Sigma[®]) como agente de tinción. Los geles se destiñen en una solución de agua:metanol:ácidoacético (10:4:1), realizándose varios cambios hasta que queda transparente. Se conserva en agua destilada hasta su secado o tratamiento fluorográfico.

E/ SECADO DE LOS GELES.

Se han utilizado dos procedimientos diferentes:

- se coloca el gel entre dos láminas de papel celofán empapadas en agua, sostenido por pinzas metálicas sobre dos marcos de metacrilato, aplicándose un ventilador en la parte inferior hasta su secado (aproximadamente 16 h).
- los geles se sitúan sobre un papel de filtro doble recubiertos de una lámina de plástico flexible. Se secan a 80°C durante 2 h con un aparato secador de geles de Bio-Rad[®] conectado a una bomba de vacío.

6.3.2. Método de Roos^[194].

Fue desarrollado para el estudio de las bases moleculares de los alelos de C4. La diferencia esencial con el método clásico es la disminución en el porcentaje de N-N'metilen-bis-acrilamida. La solución madre de acrilamida/bisacrilamida (A') es acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.18%.

Estos geles se preparan al 10% (tabla 3.2 sustituyendo A por A') con un gel concentrante del 5%. El desarrollo de la electroforesis y los procedimientos de fijación, tinción y secado se han explicado en el apartado anterior.

nota: en la fase de desteñido, estos geles, aumentan considerablemente el tamaño.

6.3.3. Electroforesis bidimensionales: tratamiento con hidroxilamina.

Se cargan dos ensayos de interacción (III.6) en uno de los pocillos formados. La electroforesis se desarrolla en su primera dimensión aplicando una corriente de 25 mA hasta que el frente atraviesa el gel concentrante (75 min) y 40 mA (hasta el final de la electroforesis), siguiendo el procedimiento descrito en III.6.3.1.

Una vez que el indicador, azul de bromofenol, ha alcanzado el fondo de la placa, se detiene la electroforesis. La tira del gel se corta suavemente con un bisturí y se incuba a 37°C en bicarbonato sódico 0.1 M pH 9.5 conteniendo 1 M de NH_2OH (Merck^R) en tubos de 25 mL. Transcurridos 90 min (en otros experimentos 3 horas), eliminamos el reactivo y se sumerge el gel en tampón de muestra de electroforesis al que previamente se añadió azul de bromofenol al 0.05%.

Extraemos la tira de la solución y la introducimos transversalmente entre dos cristales de electroforesis, para apoyarla sobre el gel concentrante de la segunda dimensión. Las condiciones electroforéticas son las mismas que en el primer gel pudiendo cambiar el porcentaje final de acrilamida o utilizar geles de bajo reticulado. Los procedimientos de teñido, desteñido y secado se han descrito en III.6.3.1.

6.3.4. Elución de los complejos de los geles de poliacrilamida.

Una vez desarrollada la electroforesis se tiñen los pocillos vecinos a la muestra a eluir que contienen patrones de peso molecular de Bio-Rad^R (nos servirán como referencia para identificar las bandas que interesan) o ensayos gemelos a las muestras que se quieren extraer. Éstos se cortan con un bisturí, se trituran con una varilla de vidrio hasta su homogeneización y se resuspenden en 2-4 mL de agua destilada o bicarbonato amónico (Merck^R) 0.1 M, manteniéndose en agitación toda la noche en una rueda giratoria. A la mañana siguiente, centrifugamos a 3000 rpm durante 10 min en una omnifuga 2 RS de Heraeus^R y el sobrenadante se precipita con 5 volúmenes de acetona. Tras 20 min de incubación a -20°C, se centrifuga de nuevo 20 min a 3000 rpm. El precipitado se lava con 1 mL de acetona y se seca con nitrógeno antes de ser resuspendido para cargarse en una columna Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia^R) o preparado para una PAGE-SDS al 10% por el método de Roos.

6.3.5. Densitometrado.

Las electroferesis bidimensionales correspondientes a los ensayos de interacción con C4A y C4B son densitometradas en un aparato Beckman^R DU-8 a 470 nm. Los complejos provenientes de las digestiones pepsínicas y tripsínicas, en un densitómetro de Molecular Dinamyc^R.

6.3.6. Fluorografía.

Tras el desteñido, los geles se sumergen en agua destilada agitándose toda la noche. A las 16 h se cambia el agua para eliminar restos precipitados y se les somete al siguiente tratamiento siempre en agitación:

- incubación durante 1 h con 200 mL de dimetilsulfóxido de Carlo Erba^R (DMSO) utilizado en anteriores fluorografías.

- incubación con DMSO nuevo 1 h más.
- incubación con una solución DMSO/PPO (120 mL DMSO y 30 g de PPO de Carlo Erba[®]) durante dos horas. El gel encoge.
- lavado con agua destilada. El gel crece y se vuelve blanco por precipitación del PPO.
- secado del gel por los procedimientos descritos anteriormente (III.6.3.1.E).

Los geles fluorografiados, así como los marcados con ^{125}I , se colocan en carcasas metálicas (Kodak[®]) para impresionar películas X-OMAT S y X-OMAT R (Kodak[®]).

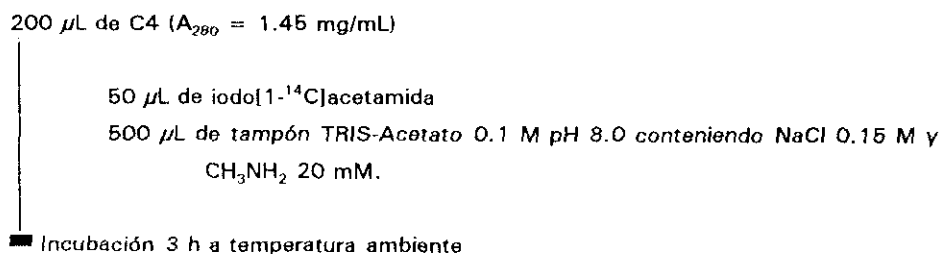
6.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN.

Las lecturas espectrofotométricas, tanto en ultravioleta (UV) como en visible, se realizan en un aparato UV-120-02 de Shimadzu[®]. La radiación UV se utiliza para la cuantificación y detección de proteínas (280 nm) y péptidos (214 nm). Los coeficientes de extinción molar son indicados en cada caso concreto, y los pesos moleculares aparecen reflejados en la introducción. La espectroscopía visible (414 nm) se emplea para el estudio del grado de hemólisis por activación de la VC.

7. MARCAJE DE C4 CON IODO[1- ^{14}C]ACETAMIDA.

Se basa en la rotura que se produce en el enlace tioéster por la presencia de metilamina^[29, 155], y la incorporación de iodo[1- ^{14}C]acetamida al grupo tiol liberado. La inactivación por CH_3NH_2 es más eficaz que con NH_2OH ^[294]. El procedimiento se esquematiza seguidamente:

Esquema 3.3. Marcaje de C4 con iodo[1- ^{14}C]acetamida.



Posteriormente se somete a diálisis intensiva, para eliminar el exceso de iodo[1- ^{14}C]acetamida, frente al tampón del siguiente ensayo.

8. DIGESTIONES ENZIMATICAS.

8.1. DIGESTIONES PEPSINICAS.

8.1.1. De los complejos de interacción.

Los precipitados obtenidos en el punto III.5 se resuspenden en 50 μ L de tampón acetato sódico 0.1 M pH 4.2. Se añade pepsina (E.C. 3.4.23.11 de Sigma^R) (5 mg/mL) en una relación enzima/sustrato de 1/25 incubándose durante 24 h a 37°C. La reacción se detiene elevando el pH con TRIS. Posteriormente se centrifuga 5 min a 11000 rpm en una Biofuga B de Heraeus^R y separamos el sobrenadante del precipitado. Este último será lavado dos veces con PBS para eliminar la posible contaminación.

8.1.2. De C4 marcado con iodo[1-¹⁴C]acetamida.

500 μ g de C4 marcado con iodo[1-¹⁴C]acetamida (III.7) se dializa frente a bicarbonato amónico (Merck^R) 50 mM. Tras liofilizar la muestra, se resuspende en 500 μ L de tampón acetato sódico 0.1 M pH 4.2. Se añade pepsina en una relación enzima/sustrato de 1/25, incubándose 24 h a 37°C. En algunos experimentos, a las 24 h vuelve a añadirse la misma cantidad de pepsina, manteniéndose la incubación 24 h más. La reacción se para elevando el pH con TRIS.

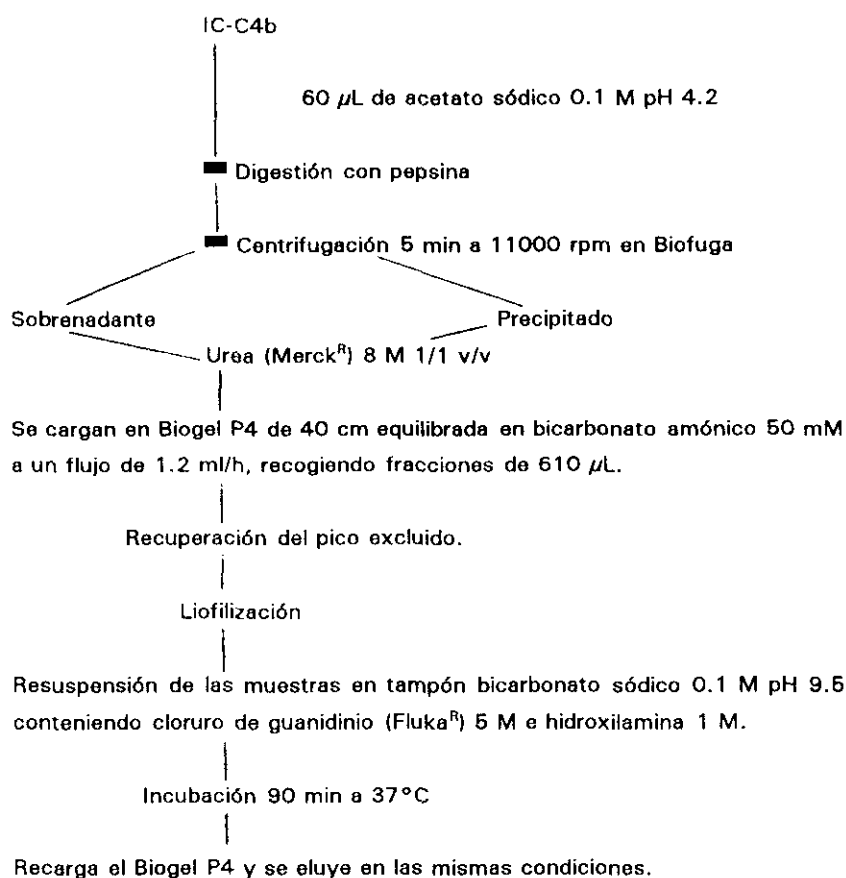
8.2. DIGESTION TRIPSINICA.

Los complejos obtenidos en III.5 se resuspenden en 100 μ L de bicarbonato amónico 50 mM. La solución es digerida con tripsina (E.C: 3.4.21.4 de Sigma^R) durante 1 h a 37°C, con una relación enzima/sustrato de 1/20. Al cabo de ese tiempo se vuelve a añadir tripsina con una relación enzima/sustrato de 1/40, incubándose 3 h más a 37°C. La reacción se para congelando las muestras a -70°C o añadiendo inhibidor de tripsina. Estas preparaciones se cargan en una PAGE-SDS al 10%. Las bandas correspondientes a la cadena H y L de la IgG se extraen del gel (III.6.3.4) y se cromatografían en una columna de Superdex 75 HR 10/30 en un sistema FPLC (III.9.2.2).

9. FRACCIONAMIENTO DE PEPTIDOS.

9.1. FILTRACION EN GEL EN BIOGEL P4.

Partimos de los complejos obtenidos en los ensayos de interacción que fueron posteriormente digeridos con pepsina (III.14.8.1.1). A continuación, se desarrolla el esquema siguiente:

Esquema 3.4. Filtración en Biogel P4 de los productos de los complejos C4-ICs digeridos con pepsina.

Paralelamente, se carga en Biogel P4 (Bio-Rad®) el digerido pepsínico de C4 (III.8.1.2). El pico radiactivo se utilizará, posteriormente, para secuenciación radioquímica previa repurificación por HPLC.

9.2. FRACCIONAMIENTO POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC).

9.2.1. De los péptidos de C4 marcados con iodo[1-¹⁴C]acetamida.

Los péptidos radiactivos de la digestión pepsínica de C4, procedentes de Biogel P4 (III.9.3.1), se cargan en una columna Novapack C18 de Waters® desarrollándose la cromatografía en un sistema HPLC de Waters® constituido por los siguientes solventes:

A - TFA (Acido trifluoroacético, Merck®) 0.16% en agua.

B - TFA 0.1% en acetonitrilo (Scharlau®).

La muestra se eluye en un gradiente cóncavo (curva 7 de un controlador automático de gradientes Waters®) desde 0 a 60% de tampón B en 60 min. Más tarde, se eleva el porcentaje a 100% de B en 1 min y se mantiene durante 14 min más, para luego, en el

minuto siguiente, volver a las condiciones de equilibrado de la columna. Se colectan fracciones de 500 μ L.

9.2.2. Filtración en gel por FPLC (Cromatografía líquida de alta velocidad para proteínas).

Los sobrenadantes de las digestiones pepsínicas (III.8.1.1) de 4 ensayos de interacción o los eluidos de las digestiones tripsínicas (III.8.2) se cromatografían en una columna de filtración en gel Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia^R) acoplada a un sistema FPLC de Pharmacia^R. Se desarrolla con un flujo de 0.5 mL/min en tampón TRIS-HCl 0.01 M pH 7.4 conteniendo NaCl 0.15 M o en bicarbonato amónico 0.05 M. Fracciones de 400 μ L son colectadas y analizadas en un contador de centelleo Beckmann^R LS 2800. La columna fue calibrada, previamente, con seis marcadores de diferente peso molecular: IgG (150 Kd), HSA (65), OVA (45), inhibidor de la tripsina (21,5), citocromo c (12,3) y aprotinina (6,5).

10. SECUENCIACION RADIOQUIMICA.

El análisis de los picos eluidos del Biogel P4 correspondientes a los fragmentos de C4 liberados de los complejos digeridos con pepsina (III.9.3.1) o procedentes del Superdex 75 HR 10/30 (III.9.2.2), se realiza en un secuenciador 470A de Applied Biosystems^R usando el programa 03RPTH. Las muestras liofilizadas son resuspendidas en 30 μ L de trietilamina al 2% o en 100 μ L de agua destilada, y aplicadas a un filtro de Biobreno (Applied Biosystems^R) sometido a tres ciclos de preparación con el programa 03RPRE. Las fracciones, a las que previamente se les han añadido 4 mL de Formula 989 (Dupont^R), se analizan en un contador de centelleo Beckmann^R LS 2800.

11. INMUNOBLOTTING.

11.1. TRASFERENCIA A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA.

Se sumergen, 14 láminas de papel Whatman n°3 y 2 de nitrocelulosa (Bio-Rad^R) del tamaño del gel que se va a revelar, en tampón TRIS-HCl 25 mM, glicina 192 mM pH 8.3 conteniendo 10% v/v de metanol y 0.005% p/v de SDS durante 15 min.

La transferencia se realiza por un sistema semiseco^[295]. Sobre el electrodo positivo de grafito se depositan 7 láminas del papel Whatman y sobre ellas las dos de nitrocelulosa. El sandwich se completa colocando el gel cubierto por las otras 7 láminas. Eliminamos las burbujas presionando una pipeta de 10 mL como un rodillo sobre la pila de láminas. El sistema se cierra con el electrodo negativo de grafito y se aplica una corriente de 150 mA durante 2 h, observándose un incremento del voltaje desde 5 a 120 V. Una vez terminada la

trasferencia, la lámina de nitrocelulosa superior se utiliza para el revelado, mientras que la inferior se tiñe con rojo Ponceau (0.1 % de rojo Poinceau de Sigma^R, 1 % de ácido acético) durante 2-3 min para determinar las pérdidas por sobretransferencia. El gel transferido es teñido con azul Coomassie (III.6.3.1.D) para comprobar la eficacia de la técnica.

11.2. REVELADO CON ANTICUERPO ANTI-Fc UNIDO A PEROXIDASA.

La lámina de nitrocelulosa se satura sumergiéndola toda la noche en una batea con tampón fosfato sódico 0.01 M pH 7.5 conteniendo NaCl 0.15 M y BSA (Sigma^R) al 0.1 % p/v.

A la mañana siguiente, se lava suavemente con agua destilada y se incuba 1 h a temperatura ambiente en agitación con una dilución 1/250 del AC anti-Fc unido a peroxidasa (Pel Freez^R) en tampón TRIS-HCl 20 mM pH 7.5 conteniendo NaCl 0.5 M y BSA 0.1 %. Tras un lavado breve con agua destilada, se mantiene 30 min a temperatura ambiente en agitación con el tampón anterior sustituyendo la BSA por Tween 20 (monolaurato de polioxietileno sorbitan, Sigma^R) al 0.05 % (v/v).

El revelado se realiza en una solución de fosfato sódico 0.01 M pH 7.5 conteniendo NaCl 0.15 M, 0.05 % p/v de cloronaftol y 16.65 % de metanol, a los que se añaden 50 μ L de agua oxigenada (Panreac^R de 33 volúmenes) por cada 100 mL de solución. Se agita suavemente hasta que aparecen las bandas. La reacción se para sumergiendo las láminas en agua destilada.

12. INMUNOPRECIPITACION.

Al sobrenadante de dos muestras de las digestiones pepsínicas de los complejos (3.11.1) se añaden 50 μ L de PBS, y se incuba, en dos alícuotas independientes, con 250 μ L de un suero de cabra anti-Fc de conejo (Nordik^R), que previamente se había acoplado a Sepharosa-CNBr (III.2.3.3.b), durante 1 h a 37°C con frecuentes agitaciones. Más tarde, se centrifugan en Biofuga B de Heraeus^R 10 min a 11000 rpm. Se mezclan los dos sobrenadantes que se reincuban con 250 μ L del inmunoabsorbente. Después de centrifugarse, las tres muestras se lavan varias veces con PBS y se resuspenden en 100 μ L del tampón de muestra de electroforesis conteniendo 10 μ L de 2-mercaptoetanol y 3 μ L de azul de bromofenol al 0.2 %. Se hierven 10 min y se cargan en una PAGE-SDS en gradiente del 6-18 %.

IV.RESULTADOS Y DISCUSION

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

1. AISLAMIENTO DEL CUARTO COMPONENTE DEL COMPLEMENTO (C4).

1.1. AISLAMIENTO DE C4AB.

Se desarrolla en tres etapas:

- a/ método de Lundwall et al. (II.2.2.1).
- b/ repurificación por FPLC (II.2.2.2).
- c/ inmunoabsorbente policlonal (II.2.2.3.c).

a/ método de Lundwall et al.^[288] A partir de 1.2 L de plasma clarificado por centrifugación y agitado en batch junto con la resina QAE-Sephadex A-50, en la cámara fría a 4°C, se desarrolla la secuencia cromatográfica expuesta en materiales y métodos. Los perfiles cromatográficos pueden verse en las figuras siguientes.

CROMATOGRAFIAS DE INTERCAMBIO IONICO

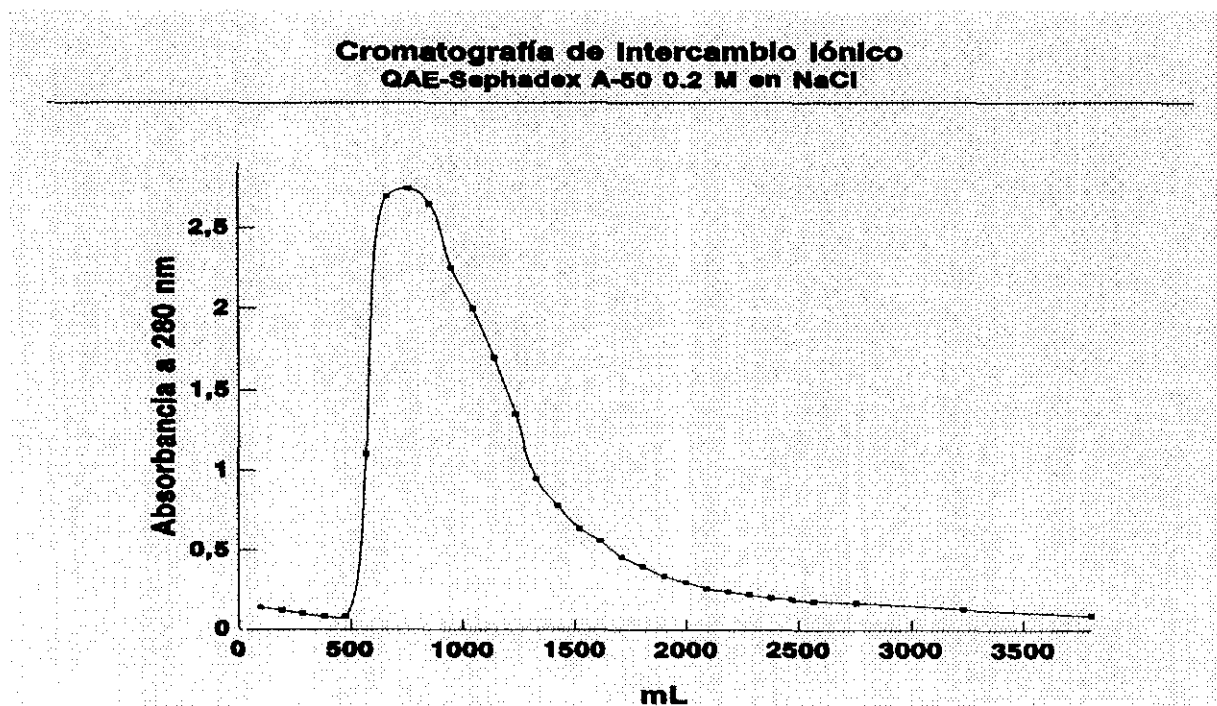


Figura 4.1 Aislamiento de C4. Cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex A50 eluida con TRIS-HCl 20mM conteniendo NaCl 0.2 M y EDTA 2 mM. En este paso se eluye C3 y C5.

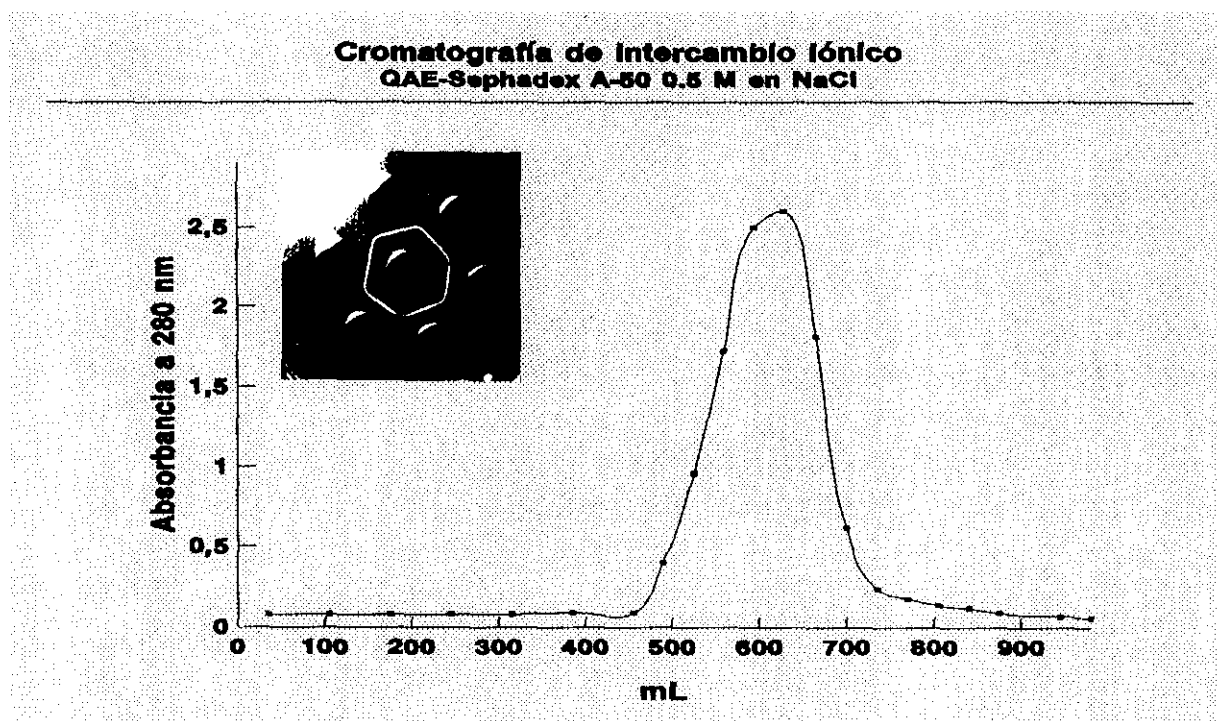


Figura 4.2 Aislamiento de C4. Cromatografía de intercambio iónico en QAE-Sephadex A50. Elución con TRIS-HCl 20 mM conteniendo NaCl 0.5 M y EDTA 2 mM. Recuadro interior: inmunodifusión doble radial con suero anti-C4 de las fracciones cromatográficas.

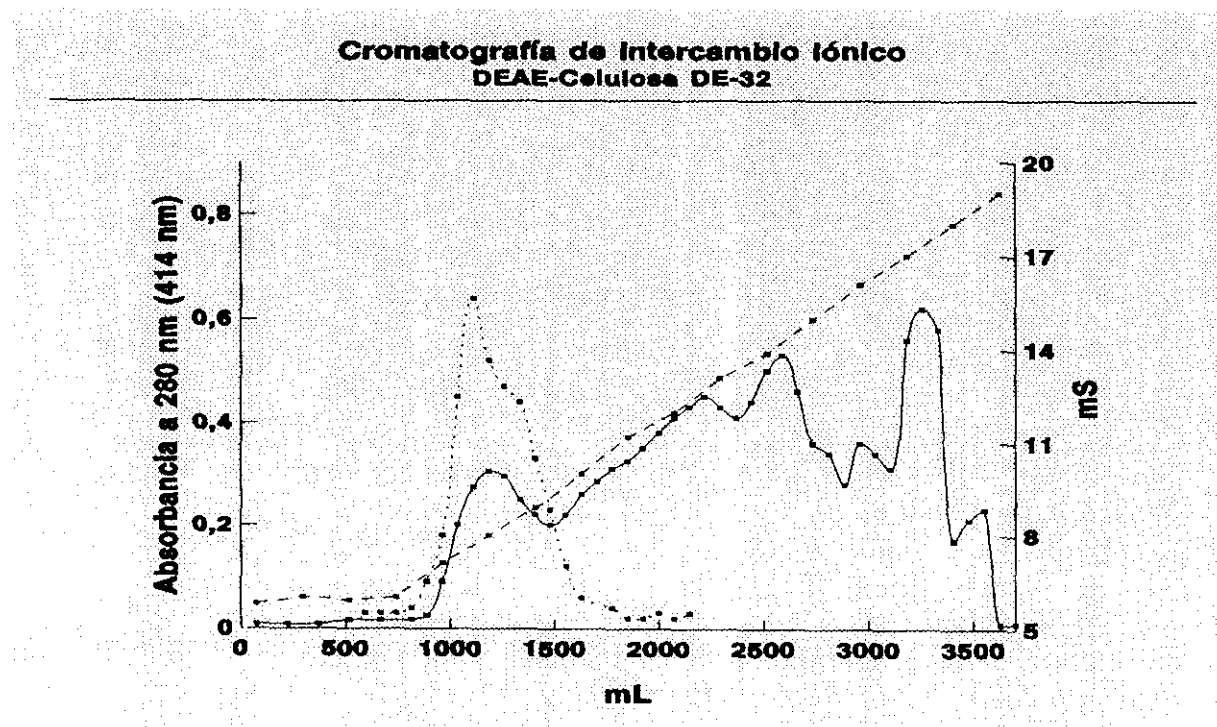


Figura 4.3. Aislamiento de C4. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa. (—) A_{280} , (.....) conductividad en milisiemens, (· · · ·) A_{414} .

El pico de proteína eluido del QAE-Sephadex A-50 (figura 4.2) se concentra y dializa frente al tampón de equilibrado de la DEAE-Celulosa. Su elución se realiza con un gradiente lineal de NaCl (figura 4.3), colectándose fracciones de 7.3 mL.

La detección de C4 durante el aislamiento se efectúa por diversos procedimientos:

- inmunodifusión doble radial (III.6.2) con un suero anti-C4 (Behring^R u obtenido por inmunización de conejos New Zealand con C4 como se describe en III.2.2.3.a). Principalmente para comprobar la presencia de la proteína en el eluido del QAE-Sephadex A-50.

- ensayos hemolíticos de las fracciones cromatográficas (III.6.1.2) en los pasos posteriores.

- PAGE-SDS (III.6.3.1) en condiciones reductoras como comprobante del grado de pureza en la filtración en gel.

FILTRACION EN GEL

Después de concentrar las fracciones positivas hemolíticamente para C4 hasta 30 mL se desarrolla un último paso de exclusión molecular (figura 4.4).

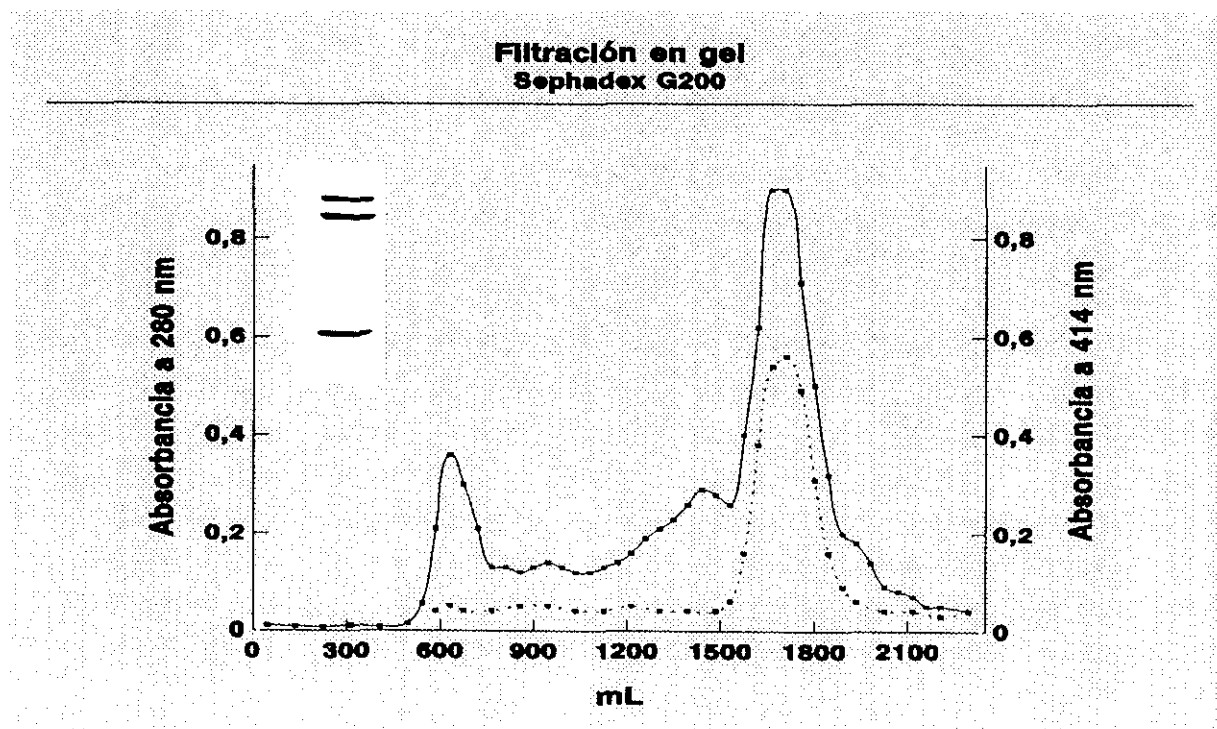


Figura 4.4. Aislamiento de C4. Filtración en gel en Sephadex G200. (—) A_{280} . (· · ·) A_{414} . Recuadro interior: PAGE-SDS del C4 aislado.

Las fracciones con alto grado de pureza electroforética (figura 4.4. recuadro interior) se mezclan y concentran hasta 1-1.3 mg/mL, almacenándose a -70°C hasta su utilización.

b/ **repurificación por FPLC.**- C4 procedente del aislamiento anterior se somete a recromatografía en un sistema FPLC de Pharmacia^R en medio ácido, según se comenta en III.2.2.2 (figura 4.5).

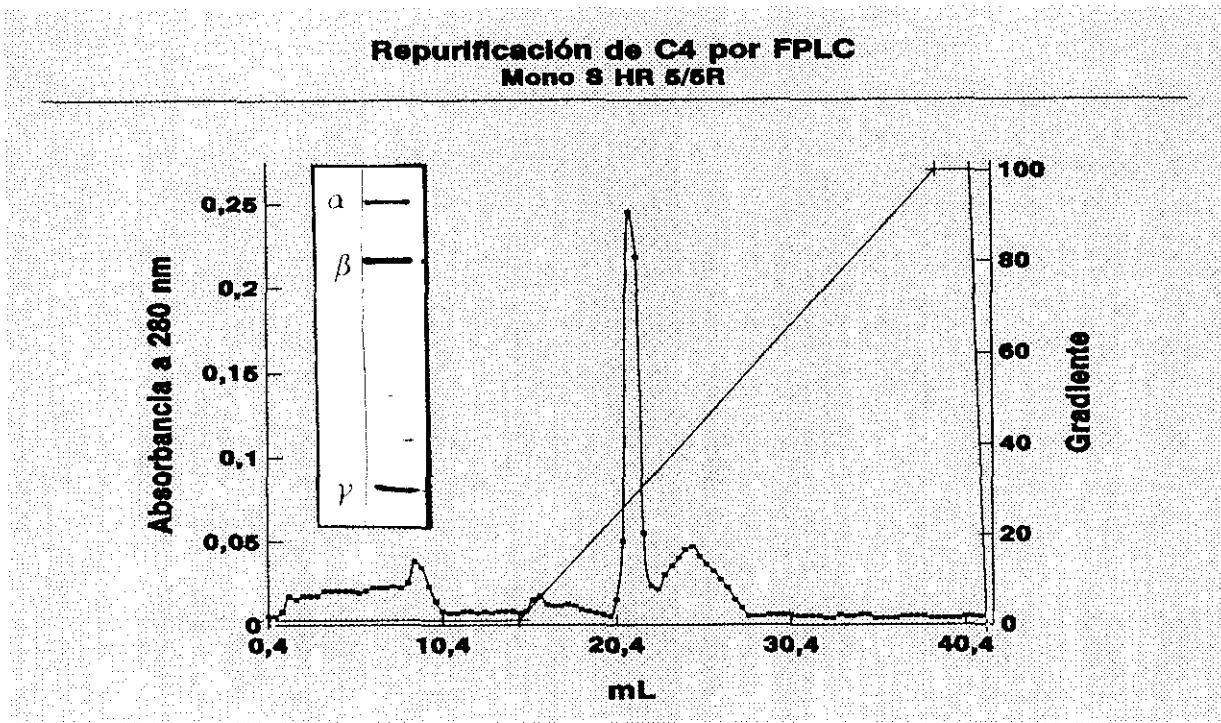


Figura 4.5. Aislamiento de C4. Repurificación por FPLC en una columna Mono S HR 5/6H. Recuadro interior: PAGE-SDS de C4 aislado.

La proteína obtenida en este aislamiento (pico mayoritario de la gráfica 4.5), una vez comprobada su pureza por PAGE-SDS, es acoplada a Sepharosa 4B activada con CNBr (III.2.2.3.b) y montada en una jeringa de 10 mL.

c/ **inmunoadsorbente policlonal.**- se cargan 30 mL de plasma-EDTA C4AB o 15 mL de plasma-EDTA monoisotópico (C4A3BQ'0 o C4AQ'0B1) en el inmunoadsorbente policlonal anti-C4. La elución se verifica siguiendo el protocolo descrito en III.2.2.3.c y su perfil cromatográfico está representado en la figura 4.6.A.

Como la proteína eluída se encuentra en muy baja concentración, tras dializarla, se concentra en un sistema cromatográfico de intercambio iónico en DEAE-Sephacel (figura 4.5.B).

¿ **Por qué utilizamos dos métodos de aislamiento ?** Cuando comenzamos los estudios con el método clásico de Lundwall et al. como base para la obtención de C4, observamos mediante PAGE-SDS, que parte de las moléculas había sufrido una degradación proteolítica en la cadena α , dando como resultado un peso molecular aparente semejante al de la cadena

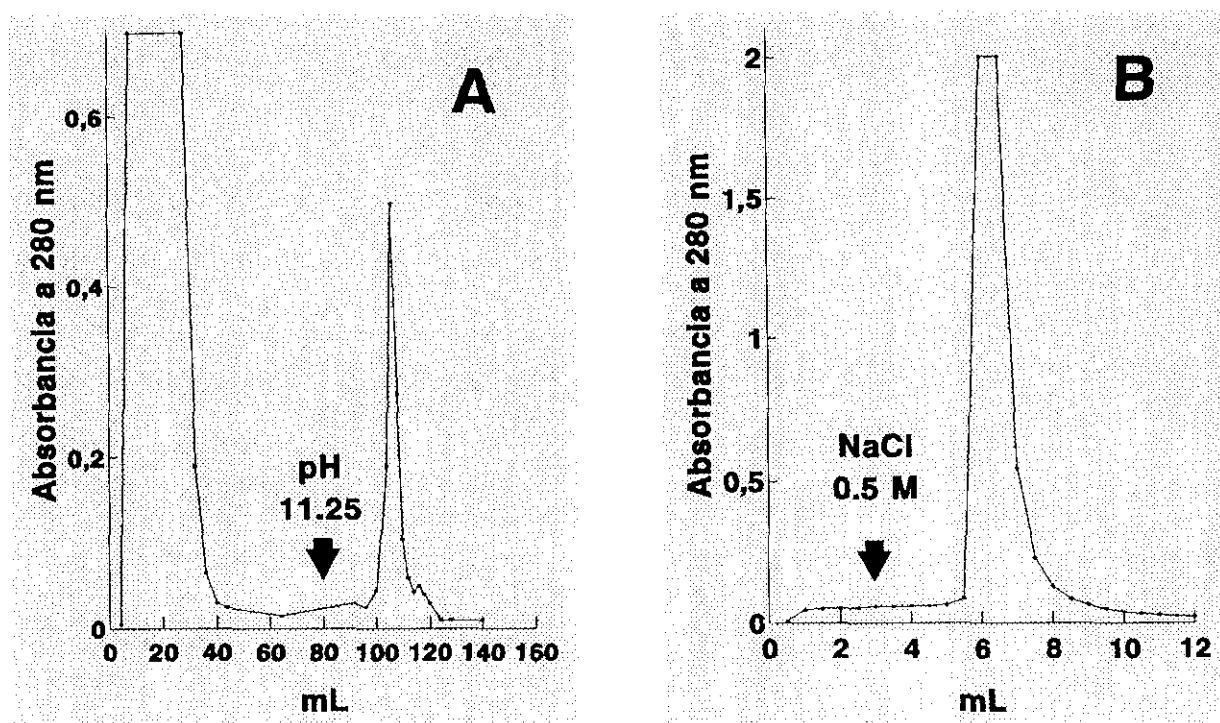


Figura 4.6. Aislamiento de C4. A/ Cromatografía de afinidad en un inmunoadsorbente policlonal anti-C4 eluido a pH 11,25. B/ Concentración de la muestra del eluido anterior.

α' , causando un número bajo de moléculas hemolíticamente activas. La probable causa de este problema estaría en la prolongada duración, entre 18 y 21 días, del método de aislamiento, que favorecería la acción de proteasas séricas, presentes de forma residual a pesar del tratamiento constante con inhibidores plasmáticos, y el desarrollo de la capacidad autolítica de la propia molécula de C4. Por este motivo, decidimos repurificar la muestra e inmunizar conejos para la obtención de un suero anti-C4, que anclado a Sepharosa 4B activada con CNBr, permitiera mejorar la calidad y la cantidad de la molécula aislada. Con este procedimiento logramos una notable incremento en el rendimiento, pasando del 28% con el aislamiento clásico^[296], a valores comprendidos entre el 65-75% con el inmunoadsorbente policlonal. Además, el número de moléculas hemolíticamente activas se incrementó desde 3.82×10^{13} , por el primer método, a $6.9-9.6 \times 10^{13}$ con el inmunoadsorbente (ver IV.4.1).

1.2. AISLAMIENTO DE C4A3 (C4B1).

El aislamiento se desarrolla a partir de 10 mL de plasma-EDTA monoisotópico de dos donantes sanos I.D. y F.B., tipados C4A3BQ'O y C4AQ'OB1 respectivamente, que se cromatografían en el inmunoadsorbente policlonal (III.2.2.3). Tras el lavado, la columna se eluye elevando el pH a 11.25 (figura 4.6.A). La proteína obtenida es concentrada en una columna de intercambio iónico DEAE-Sepharcel (figura 4.6.B). Como puede apreciarse, los perfiles cromatográficos son semejantes a los del aislamiento de C4AB.

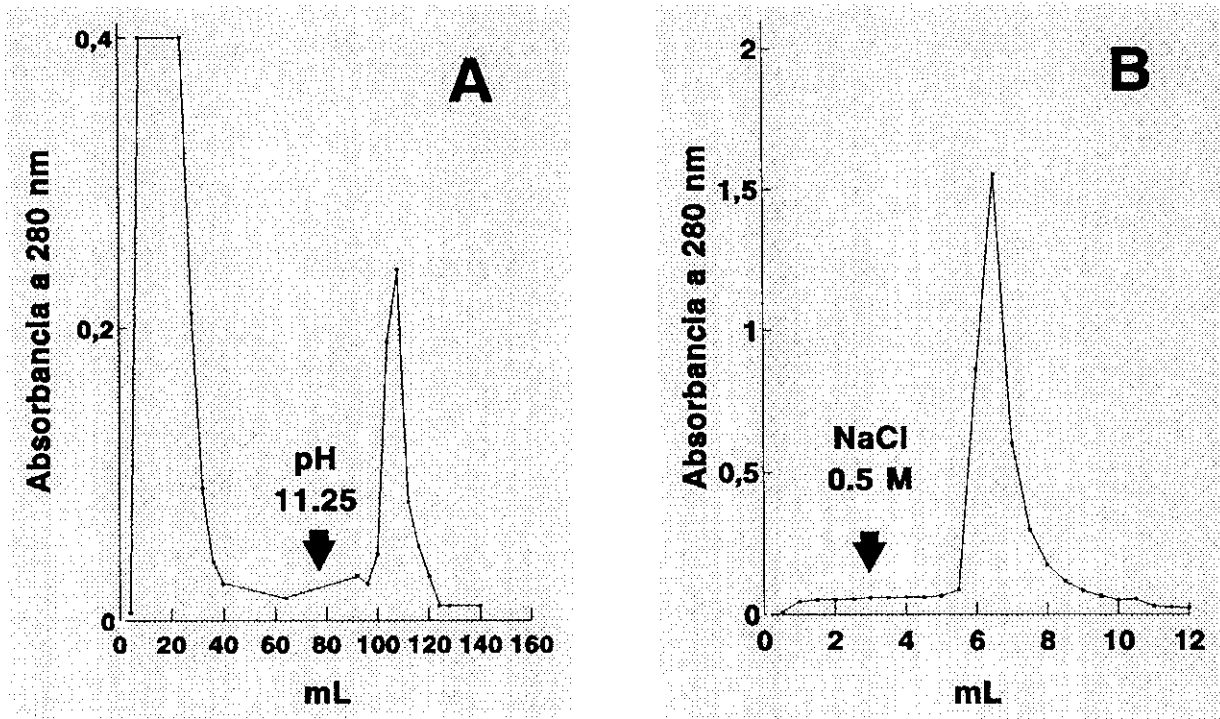


Figura 4.7. Aislamiento del isotipo C4A3. A/ Cromatografía de afinidad en un inmunoabsorbente policlonal anti-C4 eluido a pH 11.25. B/ Concentración de la muestra del eluido anterior.

1.3. AISLAMIENTO DE ISOTIPOS.

La utilización de un tercer método de aislamiento, el inmunoabsorbente monoclonal L003, queda justificada por ser un medio de separación de ambos isotipos de C4 a partir de plasma C4AB. L003, de especificidad anti-Ch^[170], reacciona con una constante de equilibrio 7 veces mayor para C4B debido a la sustitución Leu¹¹⁹¹ (C4A) por Arg (C4B)^[297]. Se utilizó preferentemente para aislar C4B, debido a la carencia de donantes habituales que presentasen tipaje C4AQ*0 (carentes de C4A).

Dos motivos fundamentales hacen que el L003 no sea fuente de obtención de C4A: primero, la disponibilidad habitual del donante I.D. (tipado C4A3BQ*0) durante las primeras etapas del estudio y, segundo, el bajo rendimiento que se obtiene de dicho isotipo por este método. Además, existe una tercera causa de orden experimental: C4A forma enlaces amida con inmunocomplejos, haciéndose insensible a hidroxilamina, que como se ha expuesto, es una de las bases metodológicas en este trabajo.

Se acopla el anticuerpo monoclonal anti-C4d, L003, a Sepharosa 4B activada con CNBr (III.2.2.4.b) y se rellena una jeringa con un lecho de 5 mL, donde se cargan 15 mL de plasma-EDTA C4AB eluyéndose la columna con un gradiente de pH (III.2.2.4.c): el primer pico corresponde a C4A y el segundo a C4B (figura 4.8).

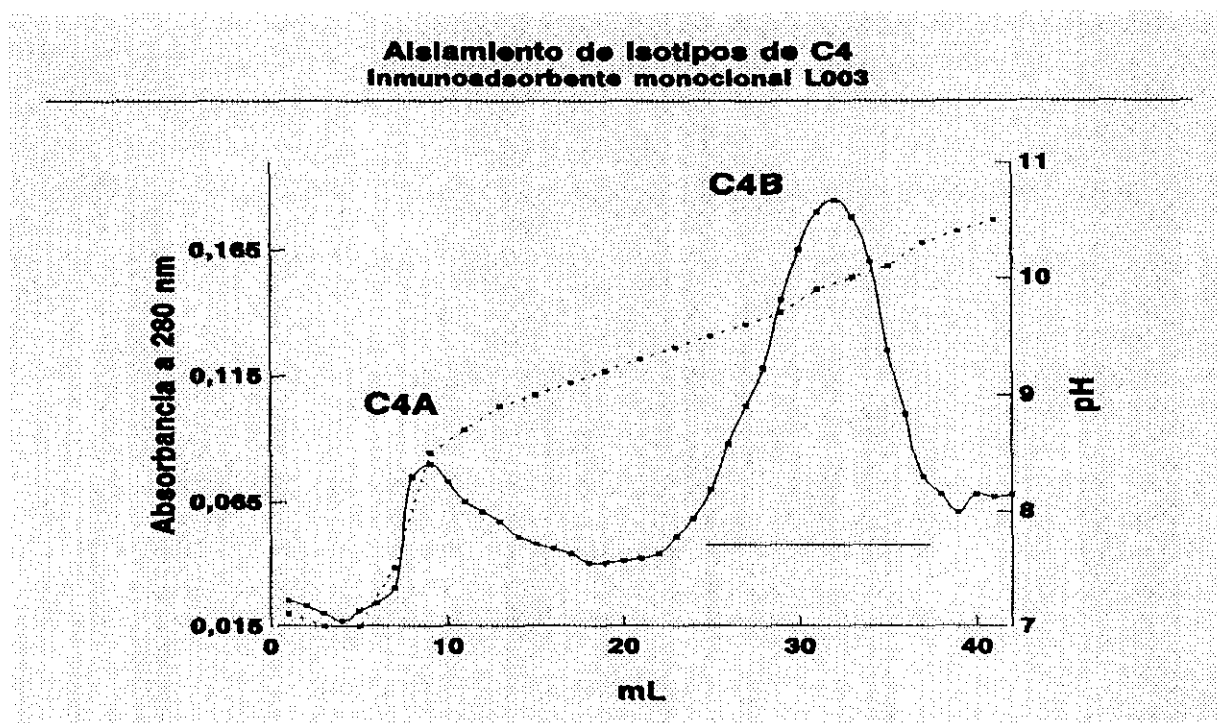


Figura 4.8 Aislamiento de isotipos de C4. Cromatografía de afinidad en inmunoadsorbente L003. (—) A_{280} . (. . .) pH. La línea recta continua corresponde a las fracciones mezcladas.

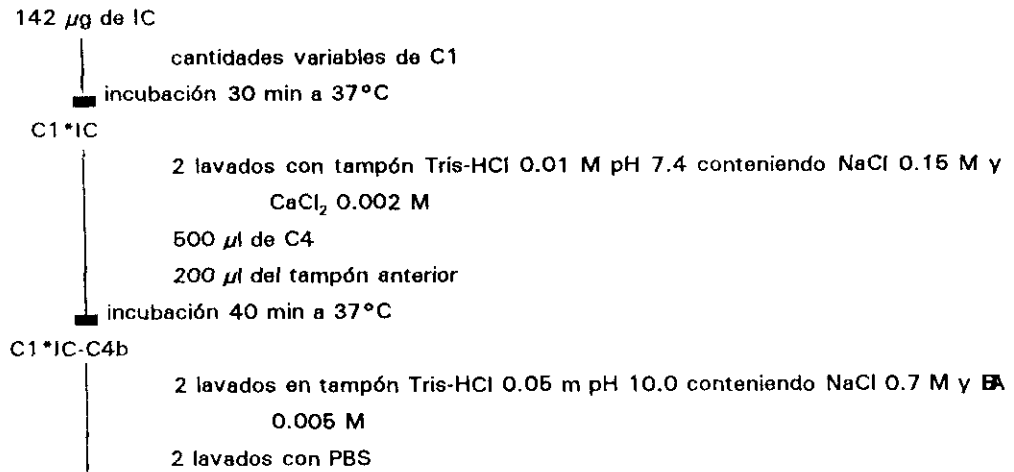
2. CONSUMO DE C4 DURANTE LA ACTIVACION DE LA VIA CLASICA DEL COMPLEMENTO.

Se sigue el protocolo diseñado para los ensayos de interacción (III.4) con algunas modificaciones que resumidamente aparecen en el esquema 4.1. Los datos experimentales se muestran desde la tabla 4.1 hasta la 4.5, y en la gráfica 4.9.

Material de partida: 142 μ g de inmunocomplejos.
C4 (1.2 mg/mL).
C1 en las cantidades especificadas en la tabla 4.1.

El método de cuantificación es por ensayo hemolítico (III.6.1) de los sobrenadantes de los experimentos de interacción (tabla 4.2).

Con los resultados de la tabla 4.2 se calcula para cada dilución el tanto por uno de hemolisis (y). A partir de él, el número promedio de células lisadas (z) según la fórmula (2) descrita en III.6.1.3 (tabla 4.3). Estos datos se ajustan a rectas de regresión cuyas ecuaciones se muestran en la tabla 4.4. Interpolando el valor $z = 1$, y considerando 2.6×10^8 eritrocitos por ensayo, obtenemos el número de moléculas hemolíticamente activas (tabla 4.5).

Esquema 4.1. Consumo de C4 durante la activación de la vía clásica.**Tabla 4.1. Diluciones seriadas de C1.**

$\mu\text{g C1}/\mu\text{g IC}$	$\mu\text{g de C1}$	$\mu\text{l de C1}$	$\mu\text{l de tampón}$
0	0	0	500
0.2	28.4	21.5	478.5
0.4	56.8	43.0	457.0
0.6	85.2	64.5	435.5
0.8	113.6	86.0	414.0
1.5	213.0	161.0	339.0

Tabla 4.2. Ensayo hemolítico del consumo de C4 restado el fondo.

		$\mu\text{g C1}/\mu\text{g IC}$					
Dilución	ng C4	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.5
10^3	300	HT	HT	HT	HT	HT	0.310 ^{NC}
5×10^3	60	HT	HT	0.494	0.458	0.379	0.207
10^4	30	HT	0.534	0.419	0.306	0.291	0.158
2×10^4	15	0.530	0.458	0.290	0.243	0.230	0.143
5×10^4	6	0.311	0.302	0.186	0.175	0.153	0.122
10^5	3	0.206	0.191	0.102	0.072	0.056	0.046

HT - Hemolisis total; ^{NC} - No considerado en el ajuste.

Fondo: 0.048; Hemolisis total: 0.637; Hemolisis espontánea: 0.012.

Tabla 4.3. Cálculo del grado de hemólisis y de "z".

$\mu\text{C1} / \mu\text{g IC}$											
0		0.2		0.4		0.6		0.8		1.5	
HT	-	HT	-	HT	-	HT	-	HT	-	ND	-
HT	-	HT	-	0.83	1.82	0.77	1.50	0.64	1.03	0.35	0.43
HT	-	0.90	2.37	0.71	1.24	0.51	0.73	0.49	1.03	0.26	0.31
0.90	2.30	0.77	1.50	0.49	0.68	0.41	0.53	0.39	0.49	0.24	0.28
0.52	0.75	0.51	0.72	0.31	0.38	0.29	0.35	0.25	0.30	0.20	0.35
0.35	0.43	0.32	0.39	0.17	0.19	0.12	0.13	0.09	0.09	0.07	0.08
y	z	y	z	y	z	y	z	y	z	y	z

HT- Hemólisis total; ND - No determinado.

Tabla 4.4. Coeficientes y rectas de regresión.

$\mu\text{g C1}/\mu\text{g IC}$	Rectas de regresión	$z = 1$	r
0	$z = 0.319 \text{ ng} - 0.117$	3.49 ng	0.996
0.2	$z = 0.144 \text{ ng} + 0.270$	5.05 ng	0.992
0.4	$z = 5.63 \times 10^{-2} \text{ ng} + 0.219$	13.84 ng	0.984
0.6	$z = 4.46 \times 10^{-2} \text{ ng} + 0.139$	19.28 ng	0.990
0.8	$z = 3.00 \times 10^{-2} \text{ ng} + 0.176$	27.46 ng	0.969
1.5	$z = 9.76 \times 10^{-3} \text{ ng} + 0.155$	86.58 ng	0.892

Tabla 4.5. Porcentaje del consumo de C4.

	$\mu\text{g C1}/\mu\text{g IC}$					
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.5
Mol. activas (10^{12})/mg	80.1	55.3	20.2	14.5	10.2	3.23
% consumo de C4	0	30.88	74.75	81.88	87.25	95.97

Finalmente se representa el porcentaje de consumo de C4 frente a μg de C1/ μg de IC (figura 4.9).

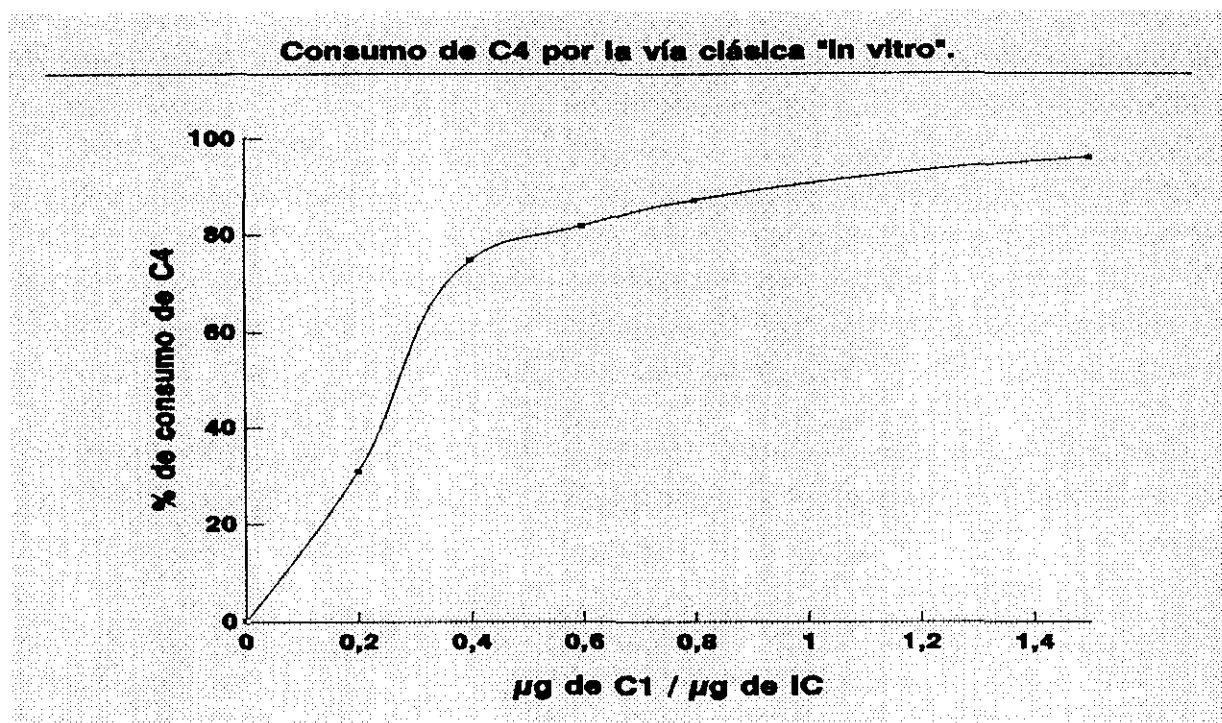


Figura 4.9. Consumo de C4 por activación de la vía clásica "in vitro".

De todo ello extraemos las siguientes conclusiones:

1. Solamente el 2.67% (entre 2.3 y 3.2% en otros experimentos) de las moléculas de C4 poseen actividad hemolítica (8×10^{13} moléculas activas/mg de C4, que corresponde a 3×10^{15} moléculas), a pesar de utilizar eritrocitos de carnero que son más sensibles a la lisis que los humanos^[298]. Este valor tan bajo puede deberse:

- moléculas de C4 sufren alteraciones estructurales durante el periodo de congelación / descongelación^[299] tras el almacenamiento, como puede detectarse por PAGE-SDS de muestras antiguas. Cuando se estudia el número de moléculas con el tioéster intacto por incorporación de ^{14}C -metilamina en C4 se obtienen valores entre el 60 y el 85%^[155, 166, 289] para muestras nuevas. Este valor decrece hasta el 31% en las muestras viejas de nuestras preparaciones.

- otra fracción inactiva el tioéster por ataque nucleofílico de una molécula de agua, previamente al ensayo y/o durante el periodo de incubación, transformándose en C4(H₂O) (también llamado C4u).

- posiblemente no todas las moléculas con el tioéster intacto serán activadas y lisarán eritrocitos (algunas se unirán al hematíe sin causar lisis o se anclarán sobre otra molécula de C4b no contabilizándose para la hemólisis).

- al tratarse de C4AB, es de suponer que el 50% de las moléculas pertenezcan a C4A, isotipo con menor actividad hemolítica^[199, 200, 204]. El 1.44% de las moléculas de C4A provocan hemólisis, valor que asciende hasta el 4.95% en C4B (ver IV.4.1).

2. Existe un progresivo consumo de C4 al incrementarse el cociente μg de C1/ μg de IC con tendencia a alcanzar una meseta cuando queda activa menos del 5% de la proteína con capacidad hemolítica inicial, indicando una alta eficacia en la activación por C1. En los ensayos de interacción por activación de la VC se utilizará un cociente de 1, que representa un consumo de alrededor del 90%.

Todos estos resultados deben tomarse con precaución, pues estamos introduciendo dos elementos de error: el peso molecular redondeado de C4 (200 Kd.) para el cálculo teórico del número de moléculas y el conteo de los eritrocitos en la cámara Neubauer^R, sujeto a gran variabilidad.

3. DETECCION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS COVALENTES FORMADOS DURANTE LA ACTIVACION DE LA VIA CLASICA ENTRE C4 E INMUNOCOMPLEJOS OVA-ANTIOVA.

3.1 IMPLICACION DE C4 EN LA INTERACCION.

Experimentalmente diseñamos una activación secuencial con componentes aislados de los primeros pasos de la cascada de la VC utilizando IC OVA-antiOVA en el punto de máxima precipitación (III.6) y marcando la molécula de C4b naciente con iodo[1-¹⁴C]acetamida en la Cys liberada del enlace tioéster tras la escisión proteolítica por C1s. Los precipitados obtenidos en los ensayos se resuspenden en tampón de muestra electroforética y se desarrolla una PAGE-SDS al 7.5% (III.6.3).

En la calle 3 del gel de la figura 4.10 se observan varias bandas de alto peso molecular que no corresponden a las cadenas α , β y γ de C4 (calle 1) ni a los componentes de los inmunocomplejos: cadenas H y L del AC y, el antígeno, ovoalbúmina (calle 2). Destacan dos bandas nítidas, A con un peso molecular aparente de 215 Kd, y B, de alrededor de 170 Kd, y una banda más difusa, A', de unos 145 Kd. Además aparecen bandas de muy alto peso molecular (C y otras) por encima de la banda principal A. Mediante un análisis fluorográfico (figura 4.11, calle 2) investigamos las bandas marcadas con ¹⁴C. Distinguimos cuatro grupos: a/ bandas de muy alto peso molecular, presentes en la electroforesis previa; b/ dos bandas nítidas que se corresponden con A y B; c/ la banda difusa A'; d/ la cadena α' de C4.

Concluimos que tras la activación de C4 por la VC, se forman complejos de alto peso molecular que portan la cadena α' de C4. Nuestros datos son acordes con los expuestos por

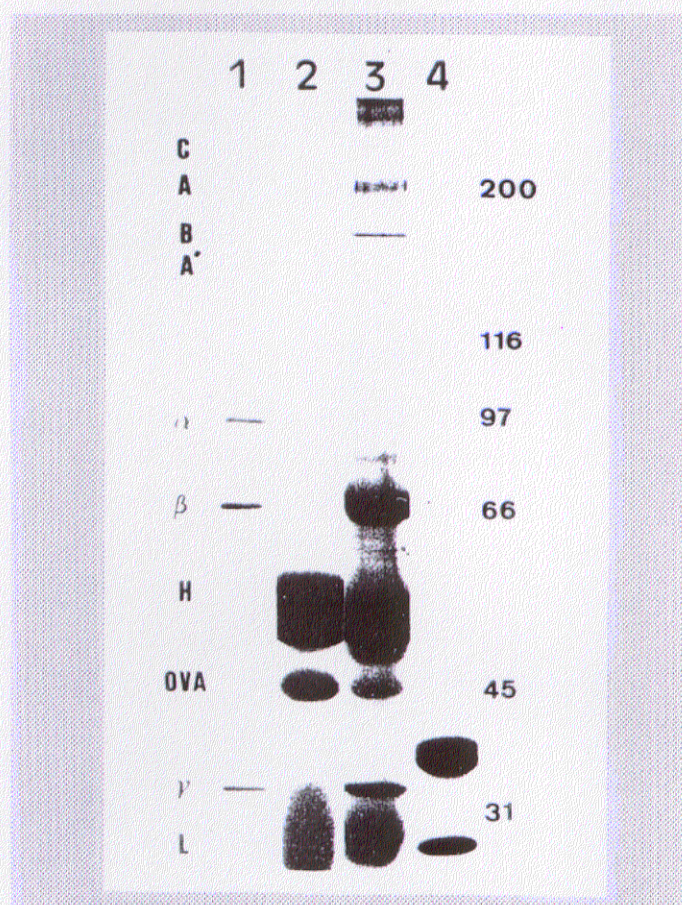


Figura 4.10. PAGE-SDS de los ensayos de interacción con ¹²⁵I-acetamida-C4. 1.C4; 2.IgG; 3. Ensayos de interacción; 4.C1q.

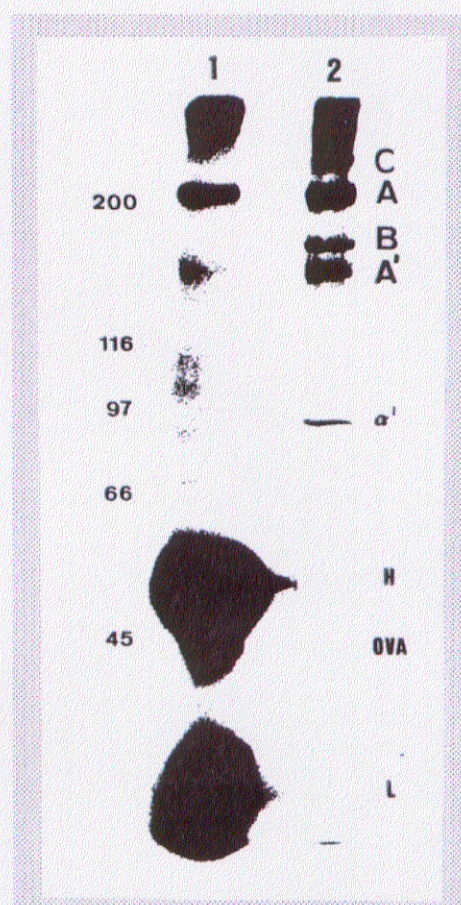


Figura 4.11. Autorradiografía de los ensayos de interacción con ¹²⁵I-IgG. 1. ¹²⁵I-IgG; 2.iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4.

otros grupos^[195,281], excepto por la aparición de A', y semejantes a los obtenidos por nosotros previamente con IC prealquilados^[282].

3.2. IMPLICACION DE LA IgG EN LA INTERACCION.

Paralelamente se diseñaron ensayos de interacción con ¹²⁵I-IgG (460000 cpm/IC). El revelado autorradiográfico (figura 4.11) nos proporciona cinco grupos de bandas: a/ bandas de alto peso molecular; b/ una banda muy nítida y mayoritaria (A); c/ una banda muy difusa (A'); d/ un grupo intermedio que posiblemente corresponda con fragmentos de IgG parcialmente reducidos debido a la sobrecarga del gel; e/ las cadenas H y L del AC.

Del conjunto de ambos experimentos, las bandas A y A' (doblemente marcadas), pero no la B (marcada sólo con ¹⁴C), serán candidatas a representar complejos covalentes entre el AC y la cadena α' de C4b. En relación con las bandas de alto peso molecular: algunas aparecen con doble marcaje (complejos IgG-(C4b)_n), mientras que otras sólo se marcan con ¹⁴C (complejos α'_n - α o α'_n - α' puesto que en ciertas condiciones pueden formarse dímeros^[300]). Su caracterización exacta sería demasiado compleja para este trabajo y, salvo breves alusiones, la aparcamos en este punto.

3.3. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LOS COMPLEJOS.

Al comparar los pesos moleculares teóricos (α' -H, 147 Kd; α' -L, 125 Kd) con los experimentales (banda A, 215 Kd; banda A', 145 Kd) las discrepancias eran enormes, por lo que en principio se dudaba de la composición de los complejos, a pesar que publicaciones anteriores las identificaban como α' -H, aludiendo a la formación de una estructura más compacta que captaría menor cantidad de SDS, disminuyendo así, su movilidad electroforética^[281].

En un trabajo previo^[282], habíamos sugerido la posibilidad de que la forma en T, Y o H de los complejos fuera la causante del mayor peso molecular aparente. Para investigar este punto repetimos los experimentos anteriores, pero en una PAGE-SDS al 5%, donde los complejos se verían menos frenados. Los resultados electroforéticos (calle A1 y B1) y autorradiográficos (^{14}C -C4 - calle A2; ^{125}I -IgG - calle B2) aparecen en la figura 4.12.

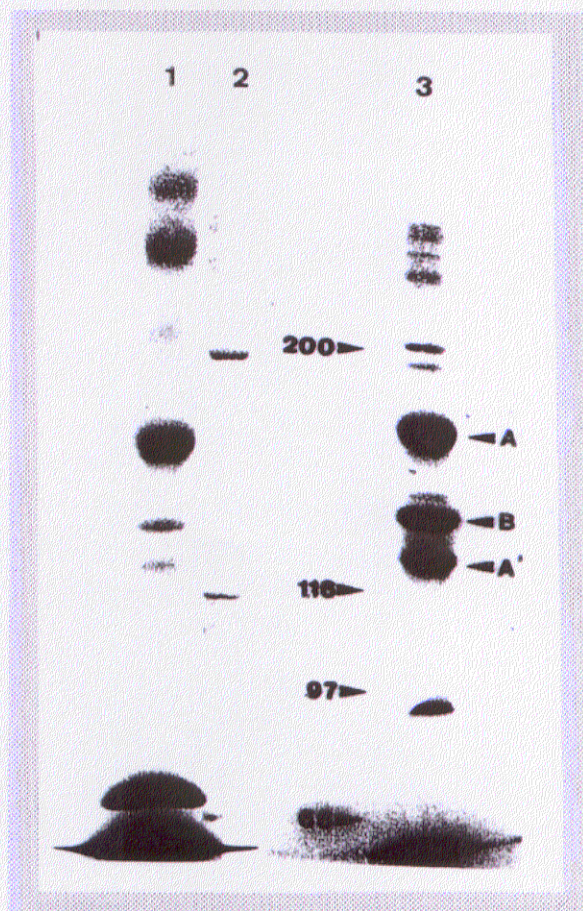


Figura 4.12.A. Interacción de C4 con IC (^{14}C -C4). 1. PAGE-SDS al 5%; 2. Patrones de peso molecular; 3. Fluorografía del gel con iodo[^{14}C]acetamida-C4.



Figura 4.12.B. Interacción de C4 con IC (^{125}I -IgG). 1. PAGE-SDS al 5%; 2. Patrones de peso molecular; 3. Autorradiografía del gel con ^{125}I -IgG.

Ahora las bandas A (157 Kd) y A' (122 Kd) adquieren unas posiciones electroforéticas más acordes con los posibles pesos moleculares reales. La banda B (134 Kd) permanece sin identificar, pero parece descartable asignarla a dímeros α' - α' ^[195, 281, 282] (188 Kd) a no ser que

una compactación excesiva de la molécula generara una mayor movilidad electroforética en condiciones desnaturalizantes, lo que sería chocante si consideramos que, las estructuras compactas, fijarían menos SDS.

El cálculo de los pesos moleculares se realiza gráficamente (log M frente a mm de gel) utilizando como patrones miosina (200 Kd), β -galactosidasa de *E. coli* (116.25 Kd), fosforilasa B (97.4 Kd) y BSA (67 Kd). Los datos se ajustan a la recta:

$$\log M = 2.617 - 7.789 \times 10^{-3} \text{ mm},$$

con un coeficiente de regresión de 0.995 (figura 4.13).

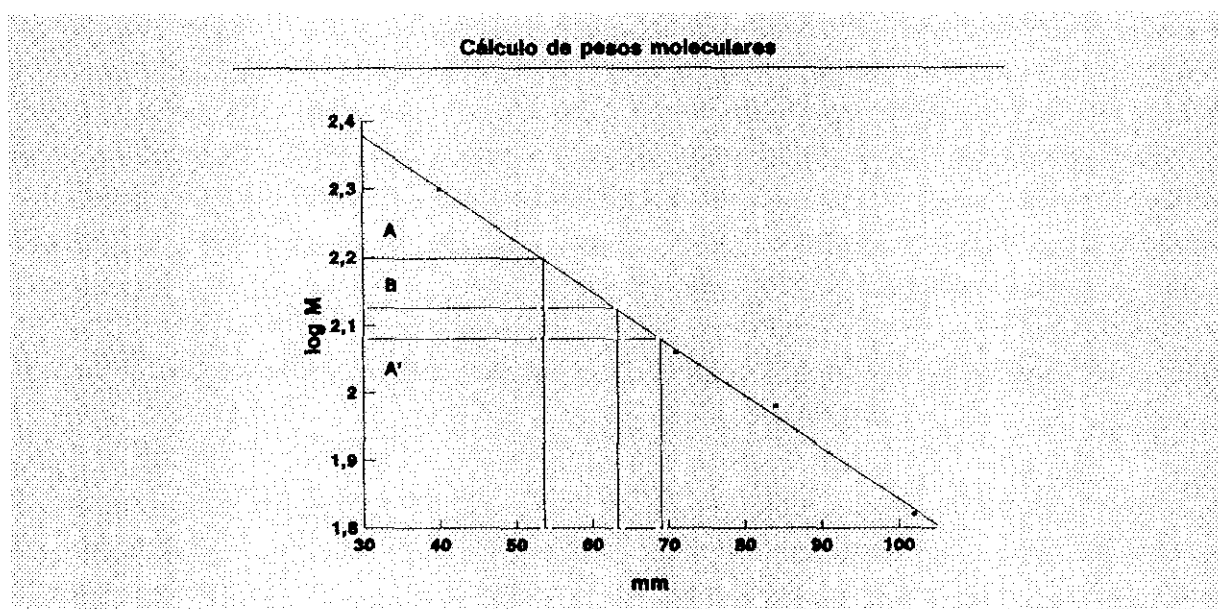
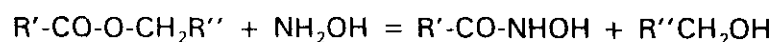


Figura 4.13. Cálculo de pesos moleculares. Gráfica de log M frente a mm de recorrido en el gel.

3.4. LA CADENA α' DE C4b FORMA PARTE DEL COMPLEJO DE INTERACCION.

La cadena α estaba implicada de modo indirecto, por un lado, por ser la portadora del marcaje con iodo[1- 14 C]acetamida en el grupo SH procedente del tioéster, y por otro, por desaparecer o disminuir en las PAGE-SDS (figura 4.12, calle 3). Para confirmar experimentalmente los supuestos anteriores, a partir de dos ensayos de interacción, se desarrolla una PAGE-SDS bidimensional (figura 4.15): 1ª dimensión al 5%; la 2ª dimensión al 10% tras el tratamiento con NH_2OH (III.6.3.3) que hidroliza los enlaces éster dando lugar a un alcohol más el ácido hidroxámico correspondiente^[156].



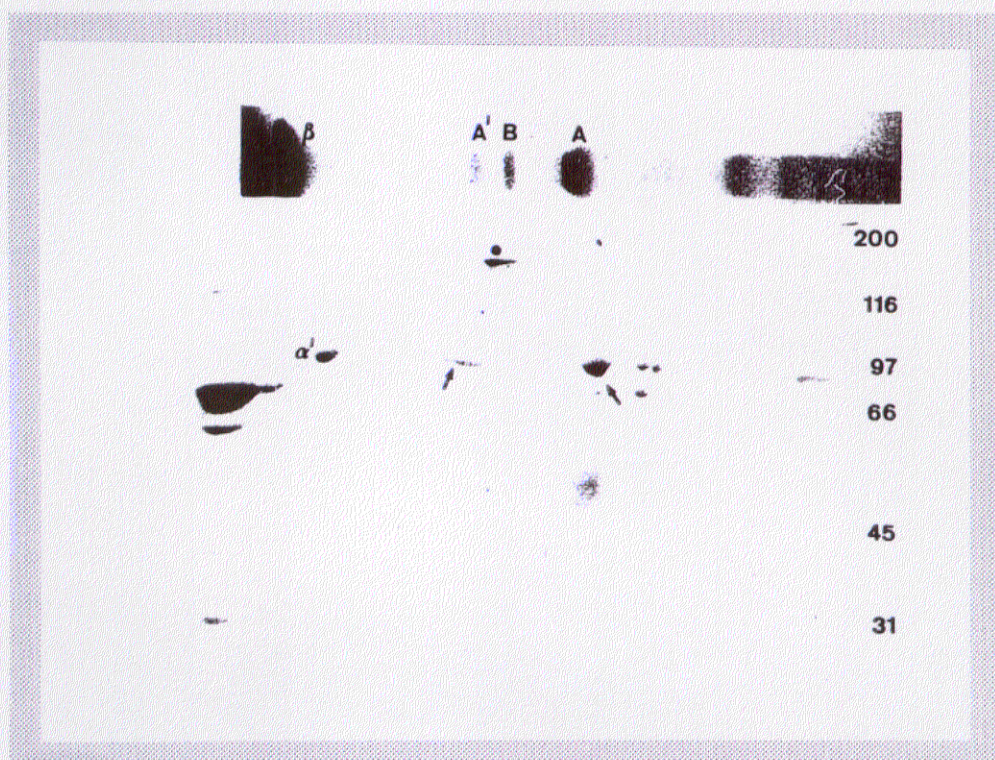


Figura 4.15. PAGE-SDS bidimensional. 1ª dimensión al 5%; 2ª al 10% tras el tratamiento con NH_2OH .

Los experimentos se realizan duplicados, uno con iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4B (formador de enlaces sensibles a NH_2OH , como se verá en el apartado 4.2) y otro con ^{125}I -IgG. En el primero de ellos, tras el revelado fluorográfico (figura 4.16) se observa un desplazamiento fuera de la diagonal (en este caso curva, al ser las dos dimensiones con geles de distinto porcentaje) de la mayor parte del marcaje de las bandas C, A, A' y del localizado a alto peso molecular, coincidente con la migración de α' de C4. La banda B permanece inmóvil. Observando detenidamente la figura se aprecia con claridad el desdoblamiento de la mayoría de las manchas desplazadas, ocasionado, probablemente, por la hidrólisis parcial de los carbohidratos o rotura de enlaces peptídicos sensibles a hidroxilamina. Investigamos la presencia de estos enlaces, principalmente Asn-Gly, para la cadena α de C4, detectándose $\text{Asn}^{1319}\text{-Gly}^{1320}$, lo que generaría un fragmento radiactivo de 83 Kd. Las bandas a la altura de 50 Kd corresponden a la cadena H de la IgG marcada de forma inespecífica (incluso tras reducción y alquilación de la IgG se detecta incorporación de marcaje^[282]) y arrastrada a lo largo del gel por sobrecarga de muestra (aproximadamente 1 mg por pocillo).

Paralelamente, se desarrollan los ensayos con ^{125}I -IgG (figura 4.17). La mancha correspondiente a la banda A se desplaza de la diagonal a la altura de la cadena H de la IgG, mientras que A' migra con un peso molecular aparente de 30 Kd (cadena L). Al menos dos bandas de alto peso molecular también se desplazan a la altura de H: posibles complejos H- α'_n .

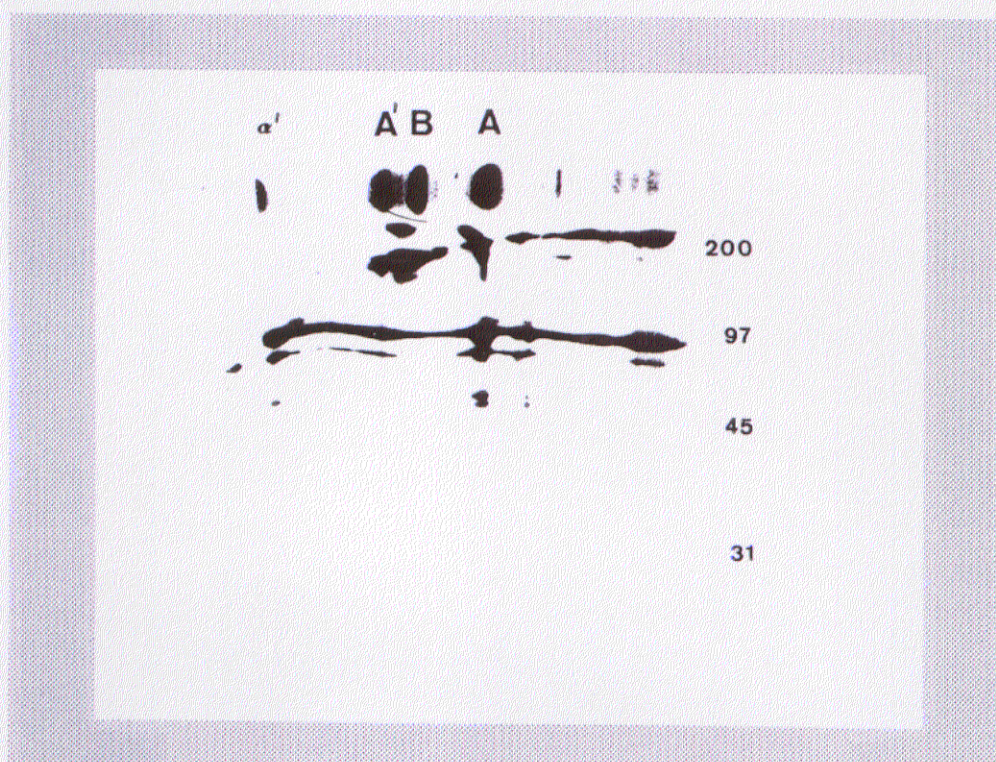


Figura 4.16. Fluorografía de los ensayos de interacción de la PAGE-SDS bidimensional tras el tratamiento con NH_2OH . Gel de la figura anterior con iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4.

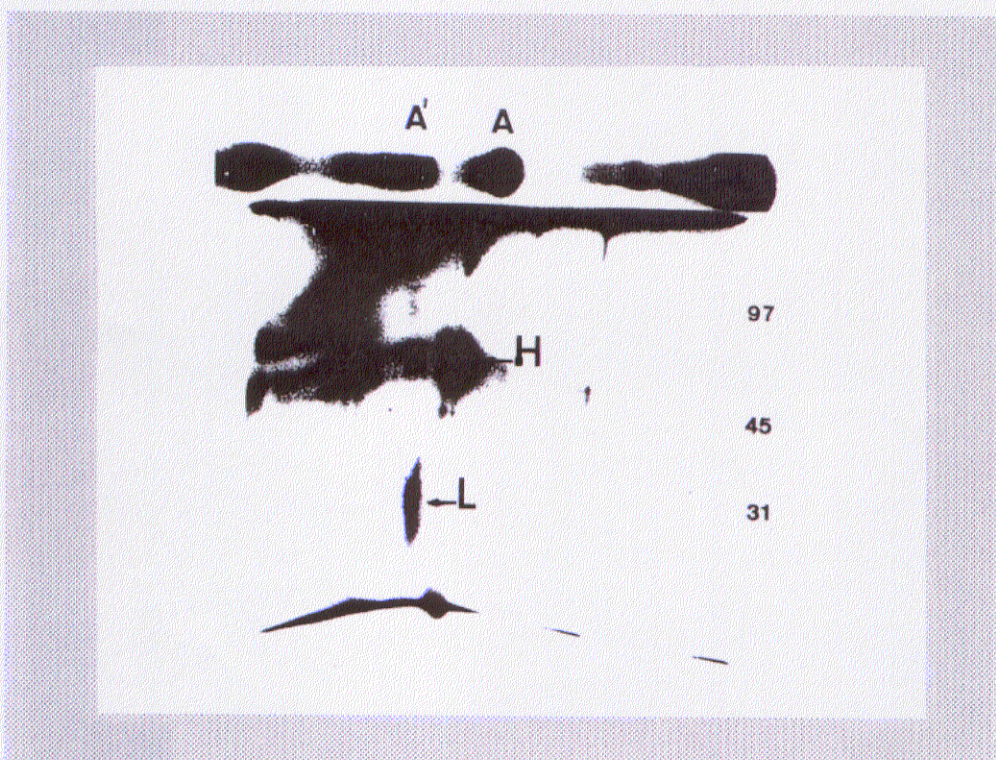


Figura 4.17. Autorradiografía de la PAGE-SDS bidimensional de ensayos de interacción tras tratamiento con NH_2OH . ^{125}I -IgG.

El conjunto de los datos apoyan, como habían indicado otros trabajos^[195, 281, 282], la formación de un complejo covalente entre la cadena α' de C4 y la cadena H de la IgG (banda

A). La banda A', no descrita anteriormente, parece constituida por α' -L. La composición molecular de B es enigmática. Campbell et al.^[281] la asignan a dímeros α' - α' aduciendo que su peso molecular reducido (migra alrededor de 130 Kd siendo su peso molecular de 188) se debe a la generación de una estructura más compacta. Si esto fuese verdad, como hemos visto antes, captaría menor cantidad de SDS y su recorrido cromatográfico sería menor, como aducen para los complejos α' -H. Secundariamente, otros laboratorios^[195, 197, 282], adscriben este aducto a los mismos complejos, aunque quizás la banda que aportan Kishore et al.^[195] corresponda a nuestra A', pues se marca también con ^{125}I . En todo caso, los enlaces formados serían amidas, por ser insensibles a NH_2OH . Dentro de nuestro laboratorio^[282] se han detectado, con IC prealquilados, complejos α' - α y α' - α' , que no pueden corresponder a la banda B por hidrolizarse con NH_2OH . Otra posibilidad puede barajarse: el atrapamiento en la red de IC de formas plasmáticas parcialmente procesadas^[138, 140]. Se ha descrito que C1s rompe pro-C4 (forma plasmática monocatenaria de C4) en dos fragmentos^[131, 140, 142], β -C4a (75 Kd no portador del tioéster) y α' - γ (130 Kd con posibilidad de captar iodo[^{14}C]acetamida). En favor de esta hipótesis está el hecho de que aparece radiactiva la cadena α' (figura 4.12) indicando que parte de C4 permanece unido por fuerzas no covalentes a la malla de IC. Por último, cabría la opción de que las dos bandas designadas B (en PAGE-SDS al 7.5% y al 5%) no correspondan a la misma estructura, lo que no parece probable por su localización en el gel y su comportamiento frente a NH_2OH (figura 4.24.A).

3.5. CALCULO DEL PORCENTAJE DE MOLECULAS DE C4 QUE FORMAN COMPLEJOS C4b-IgG.

Realizamos una PAGE-SDS con ^{125}I -IgG (figura 4.10). En vez de ser sometida a un revelado fluorográfico, se corta la calle del ensayo en tiras de 2 mm de anchura y se analizan en un contador y 1275 de LKB^R. La figura 4.18 presenta los resultados.

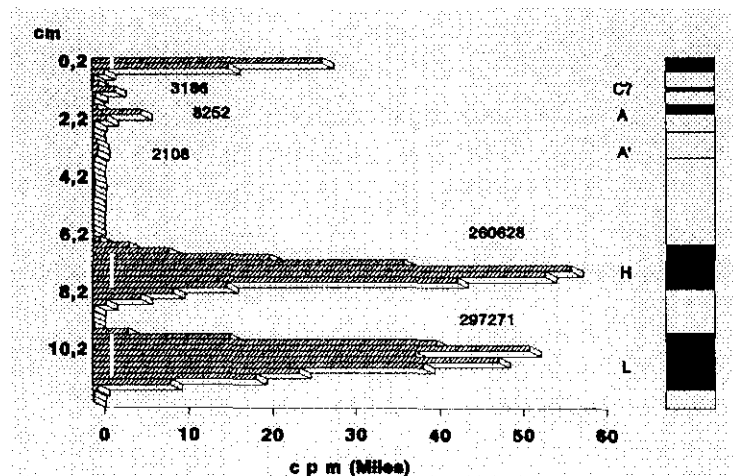


Figura 4.18. Representación esquemática de las cpm presentes en una PAGE-SDS de un ensayo de interacción con ^{125}I -IgG

A partir de estos datos, calculamos de forma aproximada el porcentaje de moléculas de C4 que forman complejos con la IgG.

Partimos de 1 mg de C4 (3.01×10^{15} moléculas) y $425 \mu\text{g}$ de IC con una relación OVA:antiOVA de 1:12 (III.3.3). La cantidad de cadena H y L se estiman en $263,52$ y $126,48 \mu\text{g}$, respectivamente, correspondiendo a 3.17×10^{15} moléculas.

Ahora calculamos las actividades específicas para ambas cadenas. La radiactividad

de la parte superior del gel más la correspondiente a las bandas de más alto peso molecular (desconocemos su constitución molecular) suman 45132 cpm, que serán divididas entre las dos cadenas (evidentemente introducimos un elemento de error, pero menor que el producido si se desprecia esta cantidad).

$$\begin{aligned} \text{cpm de H} &= (\text{radiactividad que no ha entrado en el gel}/2) + \text{banda A} + \text{banda H} = \\ &= 22566 + 8252 + 260628 = 291446 \text{ cpm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{cpm de L} &= (\text{radiactividad que no ha entrado en el gel}/2) + \text{banda A}' + \text{banda L} = \\ &= 22566 + 2108 + 297271 = 321945 \text{ cpm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{actividad específica para H} &= 291446 \text{ cpm}/(3.17 \times 10^{15}) \text{ moléculas} = \\ &= 9.19 \times 10^{-11} \text{ cpm/molécula} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{actividad específica para L} &= 321945 \text{ cpm}/(3.17 \times 10^{15}) \text{ moléculas} = \\ &= 10.15 \times 10^{-11} \text{ cpm/molécula} \end{aligned}$$

Considerando estos resultados, por un sencilla regla de tres calculamos el número de moléculas de H y L presentes en A, A' y C? (no hay certeza de que corresponda a la banda C), que serán las mismas que forman complejos con C4b.

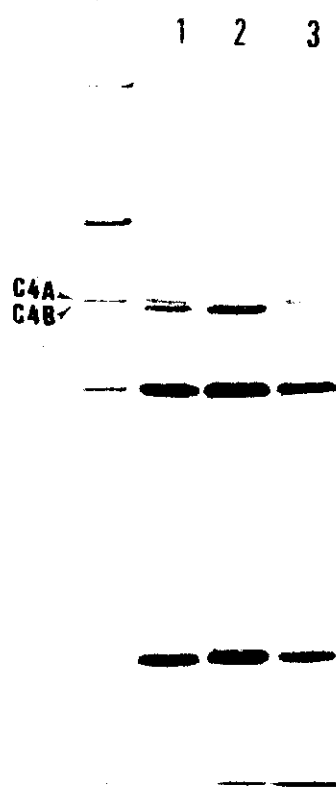
Banda	Moléculas acomplejadas	% del total (3.01×10^{15})
C?	3.46×10^{13}	1.15 ^(*)
A	8.97×10^{13}	2.98
A'	2.07×10^{13}	0.68

Es posible que la principal banda de alto peso molecular (C?) este constituida por complejos $\alpha'-\alpha'-H$ o $\alpha'-H-\alpha'$ (menos probables por impedimento estérico), por lo que las moléculas de C4b unidas a la cadena H serán dobles, el 2.3%^(*). En apoyo de esta hipótesis se encuentra el peso molecular aparente por PAGE-SDS, el doble marcaje con ^{14}C e ^{125}I y su sensibilidad a NH_2OH en los geles bidimensionales. Estos complejos serían, probablemente, los dímeros C4b-C4b detectados por Masaki et al.^[39] capaces de formar una C5-convertasa en ausencia de C3.

En total, el 5.96% (2.30 + 2.98 + 0.68) de las moléculas de C4 se fijan como C4b sobre el IC. Estos datos son superiores a los aportados por Campbell et al.^[281] (1-2% de complejos C4b-H) calculados por otro procedimiento, y más ajustados a los de Cooper, N. R. & Müller-Eberhard, H. J.^[301] (2-8% de las moléculas de C4 se unen a inmunoagregados). Estos resultados se verán confirmados por posteriores estudios densitométricos (IV.5).

4. C4A Y C4B: DOS MOLECULAS CON ALTA HOMOLOGIA Y REACTIVIDADES DIFERENTES.

Los dos isotipos de C4 presentan una homología de secuencia del 97%, tanto a nivel proteico como genético. Desde su descripción, numerosos trabajos han tratado de dilucidar



las posibles diferencias en los mecanismos de acción de ambos grupos de proteínas. Estos estudios se han dirigido en tres direcciones diferentes:

1. La descripción de las bases moleculares, realizada por Roos et al.^[194] en geles de bajo entrecruzamiento, sentó las bases de posteriores investigaciones al facilitar la diferenciación isotípica.

2. Estudios de actividad hemolítica frente a eritrocitos de carnero sensibilizados.

3. Experimentos bioquímicos que determinaron la reactividad de ambos grupos proteicos.

Con estas premisas, decidimos su investigación en nuestro sistema experimental. Comenzamos poniendo a punto la técnica electroforética de Roos et al. (III.6.3.2) como herramienta para diferenciar los dos isotipos. Esto nos permitió excluir mutuas contaminaciones. La leve diferencia en peso molecular aparente, unos 2 Kd, entre las cadenas α de C4A y C4B

Figura 4.19. Electroforesis por el método de Roos. 1. C4AB; 2. C4B; 3. C4A.

se pone de manifiesto en la figura 4.19. La banda superior de la calle 2 (C4B) tiene una movilidad electroforética menor que la misma banda en la calle 3 (C4A), y ambas, se superponen en la calle 1 (C4AB).

4.1. DETERMINACION DEL NUMERO DE MOLECULAS ACTIVAS DE LOS ISOTIPOS DE C4.

Partiendo de C4A3 (0.9 mg/mL) y C4B1 (0.6 mg/mL), se realizan estudios hemolíticos (III.6.1.3) con el fin de concretar el distinto comportamiento de los isotipos sugerido por otros grupos.

Los resultados de los ensayos hemolíticos para C4A (tabla 4.6) y C4B (tabla 4.7) se ajustan por método de los mínimos cuadrados, considerando como base molecular la teoría del "one hit" (III.6.1). Las rectas de regresión son:

$z = 0.12 \text{ ng} - 2.52$; $r = 0.999$ para C4A y

$z = 0.42 \text{ ng} + 0.02$; $r = 0.985$ para C4B

representadas en las figura 4.20.

Tabla 4.6. Ensayos hemolíticos de C4A.

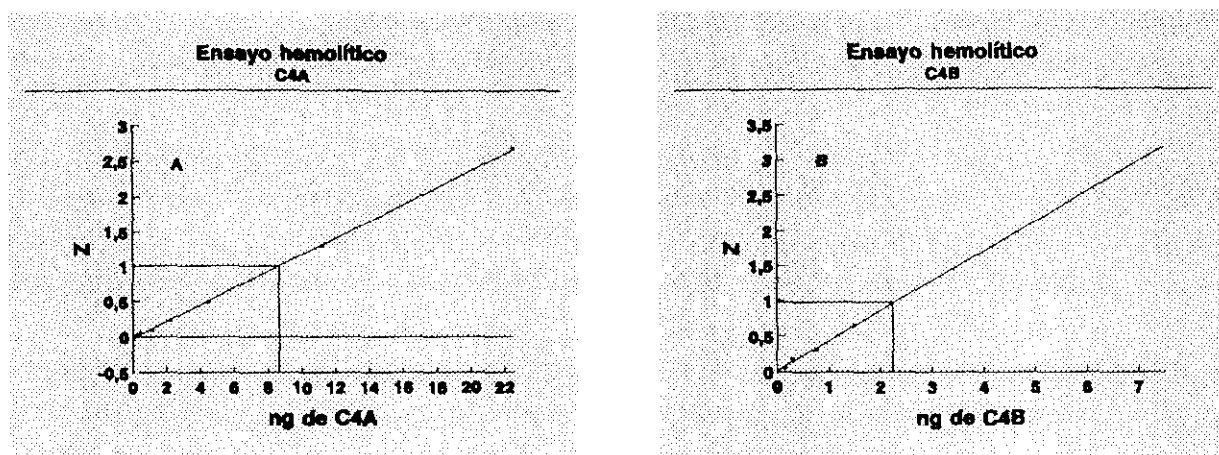
Dilución	ng	A ₄₁₄	A _{414o}	y	z
1:10 ³	225	HT	HT	-	-
1:5x10 ³	45	HT	HT	-	-
1:10 ⁴	22.5	0.579	0.531	0.931	2.68
1:2x10 ⁴	11.2	0.463	0.415	0.728	1.30
1:5x10 ⁴	4.5	0.268	0.220	0.386	0.49
1:10 ⁵	2.25	0.164	0.116	0.203	0.23
1:2x10 ⁵	1.12	0.103	0.055	0.096	0.10
1:5x10 ⁵	0.45	0.075	0.027	0.047	0.05
1:10 ⁶	0.22	0.070	0.022	0.038	0.03

HT-Hemolisis total; A₄₁₄-absorbancia a 414 nm; A_{414o}-absorbancia a 414 nm corregido el fondo. Fondo: 0.048; Hemolisis espontánea: 0.016; Hemolisis total: 0.618.

Tabla 4.7 Ensayos hemolíticos de C4B.

Dilución	ng	A ₄₁₄	A _{414o}	y	z
1:10 ³	150	HT	HT	-	-
1:5x10 ³	30	HT	HT	-	-
1:10 ⁴	15	HT	HT	-	-
1:2x10 ⁴	7.5	0.525	0.467	0.819	1.71 ^{NC}
1:5x10 ⁴	3	ND	ND	ND	ND
1:10 ⁵	1.5	0.325	0.277	0.486	0.66
1:2x10 ⁵	0.75	0.201	0.153	0.268	0.31
1:5x10 ⁵	0.3	0.146	0.098	0.172	0.19
1:10 ⁶	0.15	0.080	0.032	0.056	0.06

HT - hemolisis total; ND - no determinado; A₄₁₄ - absorbancia a 414 nm.; A_{414o} - absorbancia a 414 nm. corregido el fondo; ^{NC} - no considerado en el ajuste de la recta b. Fondo: 0.048; Hemolisis espontánea: 0.016; Hemolisis total: 0.618.



4.11. Ensayos hemolíticos de los isotipos de C4. A/ C4A; B/ C4B.

Aplicando a z el valor 1 obtenemos, por interpolación en la gráfica, 8.57 y 2.32 nanogramos, para C4A y C4B, respectivamente. Como $z = 1$ determina, como promedio, una lesión por célula, el número de nanogramos corresponde al número de hematíes lisados en el experimento (3.75×10^8).

Ajustando los cálculos para el número de moléculas hemolíticamente activas por mg de proteína, resultan 9.37×10^{13} (C4A) y 1.49×10^{14} (C4B). Las moléculas de C4B son 3.69 veces más eficaces en la lisis de eritrocitos que las de C4A, datos que se corresponden con los obtenidos por Schifferli et al.^[199, 200] (valores entre 3.2 y 3.7) e Isenman, D.E. & Young, J.R.^[204] (C4A:C4B, 4:1). Hemos detectado variabilidad en nuestros experimentos, encontrando, a veces, resultados más coincidentes con Law et al.^[196] (C4B:C4A, 2:1), dependiendo de las preparaciones de C4 y, probablemente, del estado de los eritrocitos de carnero. A pesar de todo, siempre C4B es más activo hemolíticamente.

4.2. LOS ISOTIPOS DE C4, C4A Y C4B, FORMAN COMPLEJOS ELECTROFORETICAMENTE DIFERENCIABLES.

4.2.1. Geles de poliacrilamida de bajo reticulado permiten la diferenciación de los complejos formados con C4A de los de C4B.

Experimentos, ya comentados, verificados a finales de los años 70 por Roos et al.^[194], permitieron diferenciar los isotipos de C4 mediante geles de bajo reticulado. Siguiendo esta metodología (III.5.3.2), realizamos geles al 10% de los complejos de interacción con iodo[1- 14 C]acetamida-C4A, iodo[1- 14 C]acetamida-C4B y iodo[1- 14 C]acetamida-C4AB que pueden compararse con ensayos cargados en un gel tradicional en la figura 4.21.

En la calle 4 (C4A) se observan 5 bandas de alto peso molecular (complejos de interacción), además de las correspondientes a las cadenas β y γ de C4, H y L del anticuerpo y el antígeno (OVA). Cuando se compara con la calle 1, se aprecia un desdoblamiento de la

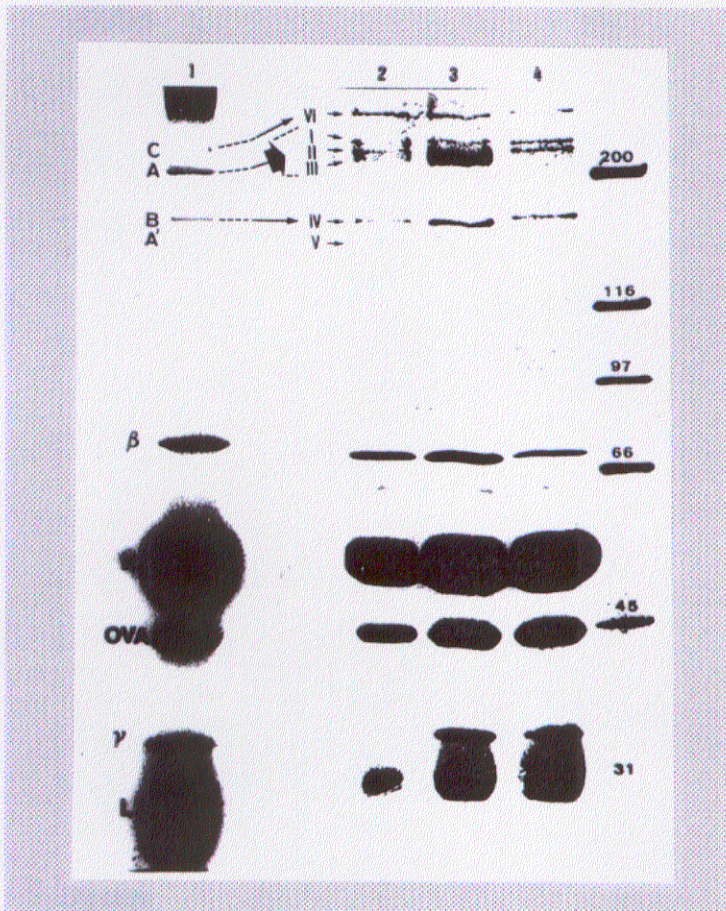


Figura 4.21. PAGE-SDS de complejos de interacción con iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4b. 1. Método de Laemmli al 7.5% (C4AB); 2-4. Método de Roos al 10%: C4AB (2), C4B (3) y C4A (4).

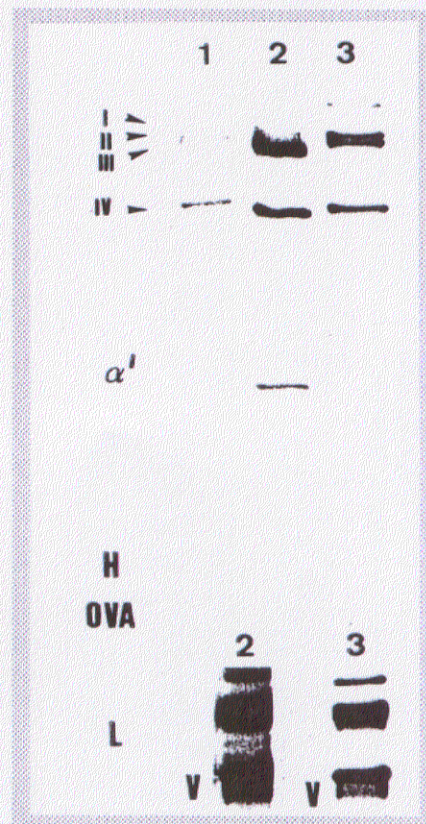


Figura 4.22. Fluorografía del gel anterior. 1. C4AB, 2. C4B, 3. C4A.

banda A (complejos α' -H) en las bandas I y II. La banda A' (complejos α -L es casi imperceptible al haberse cargado menos material), B y C (complejos de alto peso molecular) no sufren alteración, representándose como V, IV y VI, respectivamente.

En la calle 3 (C4B), la disposición es similar excepto que la banda II (banda nítida) desaparece y es reemplazada por III (gruesa y difusa), que migra ligeramente más rápido.

En la calle 2 (C4AB), como cabía esperar aparece la suma de las bandas de los carriles 3 y 4, apareciendo I, II y III.

En la fluorografía subsiguiente (figura 4.22), como esperábamos, las seis bandas superiores aparecen marcadas, indicando la presencia de α' en su constitución. En relación a las bandas I, II y III, no podemos afirmar que todas sean complejos de interacción (como proceden de A, I y/o II/III correspondá a α' -H), porque debido a su proximidad (solapan) no fue posible repetir los ensayos con ¹²⁵I-IgG. Si alguna representa α' - α' , enmascarado en los geles tradicionales, no puede ser precisado.

De estos experimentos deducimos, que al igual que los propios isotipos, los complejos



Figura 4.23. A. Fluorografía de una PAGE-SDS bidimensional de los complejos de interacción con C4A. B. Densitometrado del desplazamiento de la banda II.

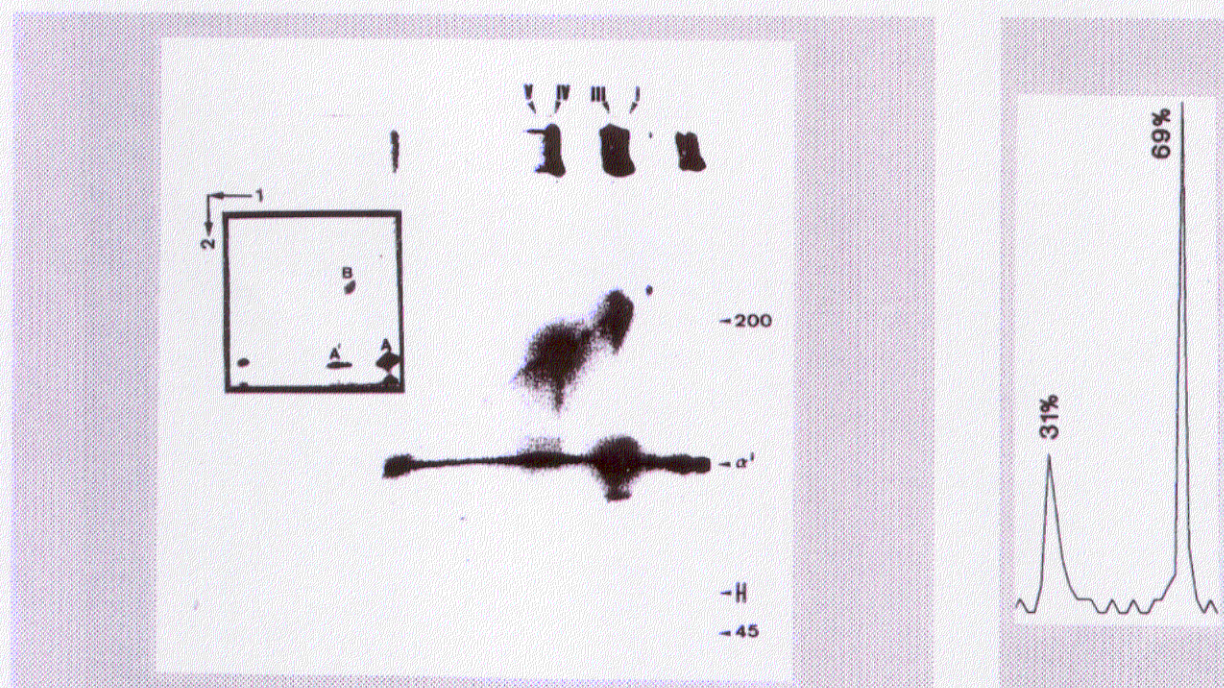


Figura 4.24. A. Fluorografía de una PAGE-SDS bidimensional de los complejos de interacción con C4B. En el recuadro interior prolongado el tratamiento hasta 3 h. B. Densitometrado del desplazamiento de la banda III.

formados entre ellos y la IgG son electroforéticamente diferenciables en geles de bajo entrecruzamiento: C4A, con dos bandas nítidas (I y II), y C4B, con una nítida (I) y otra difusa (III).

Para comprobar la naturaleza de los enlaces covalentes entre iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4b (de ambos isotipos) e IgG realizamos PAGE-SDS bidimensional en geles de bajo reticulado, con una segunda dimensión posterior al tratamiento con NH₂OH (III.6.3.3).

La fluorografía para C4A (figura 4.23.A) demuestra que un mínimo porcentaje de todas las bandas estudiadas sale fuera de la diagonal a la altura de la cadena α' de C4b, sugiriendo la formación de enlaces resistentes a NH₂OH (amidas); mientras que en la correspondiente a C4B (figura 4.24.A), la mayoría de la radiactividad se detecta al nivel de α' en todas las bandas menos en B, indicando enlaces éster. Esta reactividad diferencial había sido demostrada en ensayos con glicina y glicerol^[196,202] y en experimentos de interacción de C4b con eritrocitos^[197]. En un trabajo previo de nuestro laboratorio^[282] con C4AB se había obtenido un 33% de enlaces sensibles a NH₂OH, lo que estaría de acuerdo con los datos aportados aquí con isotipos separados. Posteriormente, Kishore et al.^[195], estudiando la formación de complejos con IgG en fase fluída llegó a los mismos resultados.

Todas las bandas de alto peso molecular permanecen en la diagonal cuando los complejos son C4Ab-IgG, mientras que son desplazadas a la altura de α' en los C4Bb-IgG.

En la cuantificación densitométrica (figura 4.23.B y 4.24.B) de las bandas diferenciales, II (en C4A) y III (en C4B), solamente el 2% de la radiactividad queda fuera de la diagonal en II, mientras que en III, el porcentaje se eleva al 66%, incrementándose a 90% por incubación con NH₂OH más prolongada (recuadro de la figura 4.24.A). Esto nos hace suponer que C4B forma exclusivamente enlaces éster y que el porcentaje de complejos que se mantenían en la diagonal era causa del efecto incompleto del tratamiento con NH₂OH, remarcado en las bandas mayoritarias, quizá porque la proteína se encuentra más compactada.

4.2.2. La banda A de los geles de Laemmli es el origen de los dobletes en los geles de bajo reticulado (Roos).

Se hacía necesario confirmar que la banda A verdaderamente se desdoblaba. Para ello, partiendo de dos ensayos de interacción con iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4B se desarrolla una PAGE-SDS en geles de Laemmli al 7.5% (III.6.3.1). Dos zonas de 0.5 cm conteniendo las bandas A y B son eluídas del gel (III.6.3.4), precipitadas con acetona y cargadas posteriormente en un gel de bajo entrecruzamiento al 10% (III.6.3.2).

Claramente se observa que las bandas I y III proceden de A (figura 4.25), mientras que la banda IV se corresponde con B (figura 4.26). En ambos casos se aprecia α' desprendida

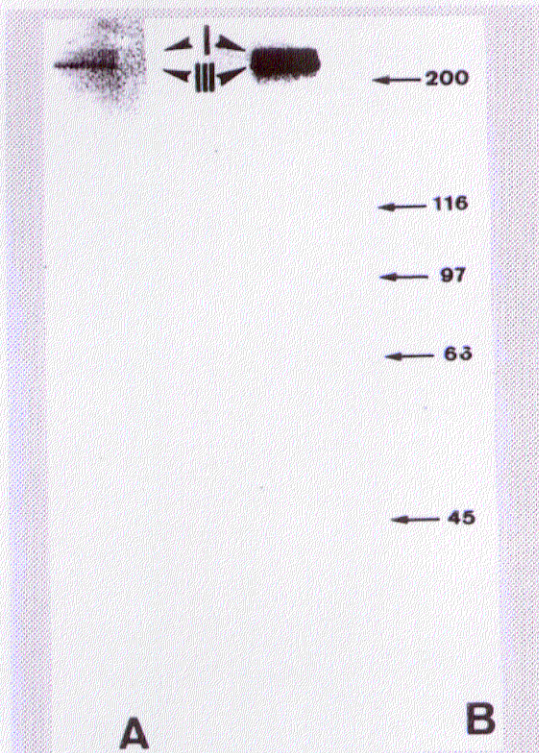


Figura 4.25. Banda A extraída de los geles de Laemmli al 7.5%. A. PAGE-SDS de Roos al 10%. B. Fluorografía correspondiente.

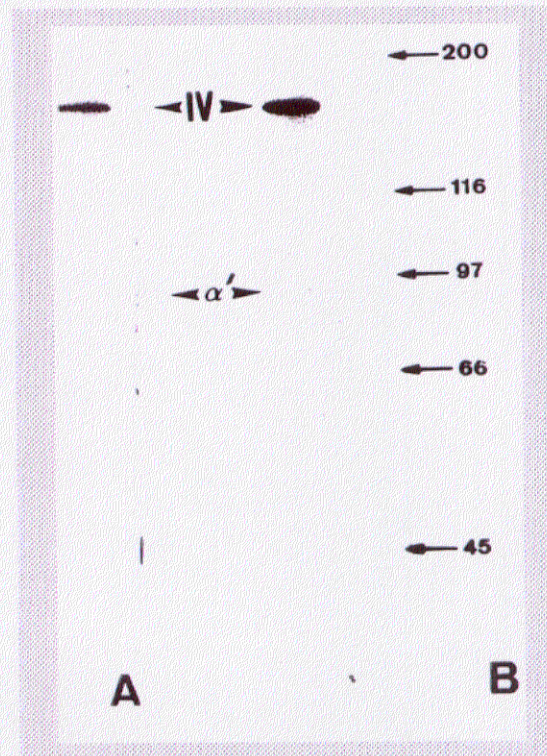


Figura 4.26. Banda B extraída de un gel de Laemmli al 7.5%. A. PAGE-SDS de Roos al 10%. B. Fluorografía correspondiente.

de los complejos por hidrólisis durante el tratamiento. La sombra difusa debajo de IV corresponde a V, que por su proximidad es eluida conjuntamente.

5. CONFIRMACION DE LOS COMPLEJOS α' -L.

Basándonos en la propiedad de la IgG de conejo de ser resistente a tripsina^[278], los complejos iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4Bb-IgG son digeridos y cargados en una PAGE-SDS al 10% (figura 4.27) con intención de reducir el tamaño del fragmento de C4b unido a la IgG. El fragmento tróptico de C4 generado por digestión terminal en la zona del tioéster está compuesto de 18 aminoácidos, por lo que los complejos α_{try}' -H y α_{try}' -L solaparán con las cadenas H y L en la electroforesis.

El análisis densitométrico de las áreas radiactivas (figura 4.28), estimando el leve marcaje inespecífico que aparece en el control, indica que un 15.13% de las dpm se localizan a nivel de L (complejo α_{try}' -L) y un 84.87% en H (α_{try}' -H), consecuentemente, la formación de α_{try}' -H será 5,61 veces mayor que la de α_{try}' -L. Estos datos se ajustan bien con los obtenidos por otro procedimiento (¹²⁵I-IgG) en IV.3.5 (α' -H: C + A = 1.15 + 2.98 = 4.13; α' -L: A' = 0.68; la relación α' -H/ α' -L es 6.07) considerando que una pequeña proporción de complejos α' -H no ha completamente sido digerida, como se observa en la gráfica 4.28.B.

En un experimento paralelo, se eluyen los complejos (III.6.3.4) con bicarbonato amónico, se separan en dos alícuotas, se liofilizan y una de ellas se trata con NH_2OH (III.6.3.3). Luego, ambas se cromatografían en una columna de Superdex 75 H/R 10/30 en un sistema FPLC (III.9.2.2).

En la gráfica 4.29 advertimos que tras el tratamiento con NH_2OH (...) parte del pico radiactivo ($\alpha'_{\text{try}}\text{-L}$, —) se desplaza hacia la zona del volumen de exclusión, indicando que un péptido de bajo peso molecular se ha desprendido del complejo. Para comprobar que el fragmento pertenece a la cadena α de C4 y no es fruto de una rotura secundaria del reactivo sobre L (aunque no se observa radiactividad inespecífica en la figura 4.27), sometemos el péptido liberado a un análisis de secuencia radioquímica. Aparece radiactividad en el segundo ciclo, señalando que la rotura tripsínica se produce en un enlace dos residuos anterior a la iodo[1- ^{14}C]acetamida-Cys (figura 4.29, recuadro interior). Al comparar con la secuencia conocida^[118] ...LLRLPR-GC*GEQTMIIYA... los datos son compatibles con la escisión en el enlace Arg-Gly.

Como control, se verifican los mismos experimentos con el complejo $\alpha'_{\text{try}}\text{-H}$ extraído del gel (figura 4.30). El péptido liberado por NH_2OH eluye en las mismas fracciones y tiene la misma secuencia radioquímica (figura 4.30, recuadro interior) que el procedente de $\alpha'_{\text{try}}\text{-L}$.

Todos estos datos sugieren fuertemente la formación de un enlace covalente entre la cadena α' de C4b y la cadena L de la IgG de conejo en la activación de la VC por IC. Aunque no se pueden descartar completamente roturas secundarias por NH_2OH en las dos cadenas de la IgG, con marcaje inespecífico dos residuos detrás, parece poco probable que esto pueda ocurrir. No hemos podido localizar en la secuencia de las regiones constantes zonas con estas características (enlaces Asn-Gly próximos a Cys). Estas premisas

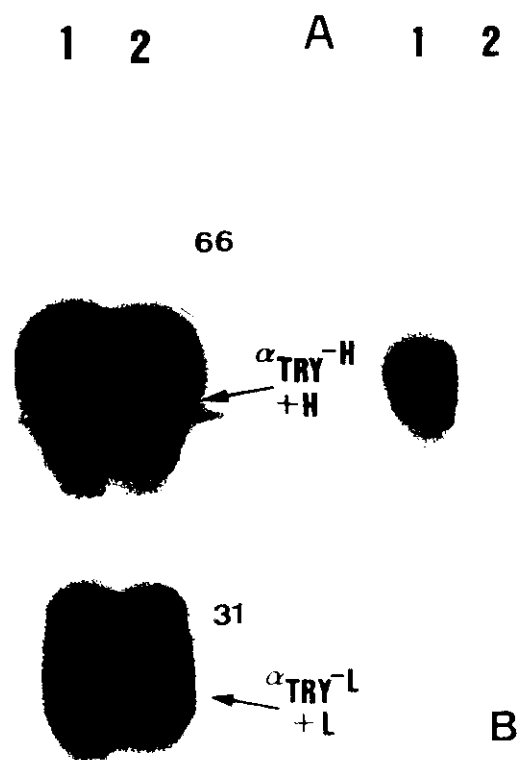


Figura 4.27. PAGE-SDS de los complejos C4b-IgG digeridos con tripsina. A/ Electroforesis: 1. C4b-IgG; 2. Control con IC*C1 en ausencia de C4. B/ Fluorografía: 1. C4b-IgG; 2. Control.

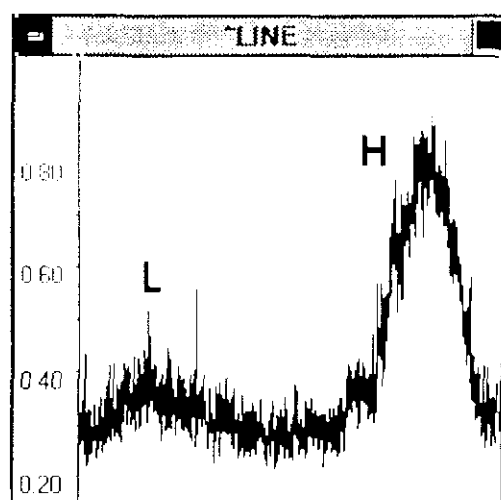


Figura 4.28. Análisis densitométrico lineal de los complejos $\alpha'\text{-L}$ y $\alpha'\text{-H}$.

se verán corroboradas por los experimentos del punto 6.

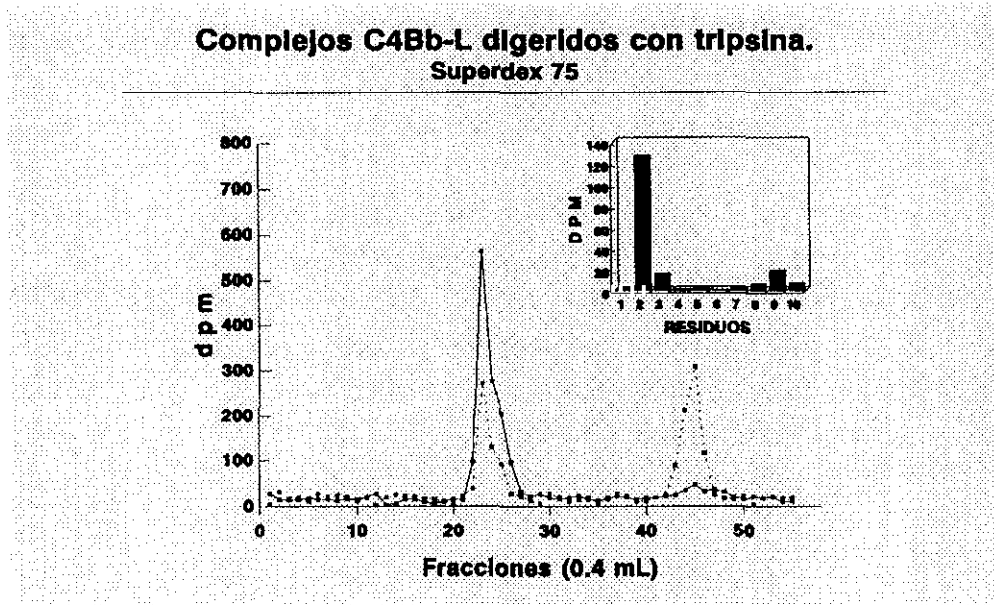


Figura 4.29. Complejo α_{trv} -L. Filtración en Superdex 75 del complejo α_{trv} -L sin tratar (—) y después del tratamiento con NH_4OH (· · ·). Recuadro interior: secuencia radioquímica del péptido liberado.

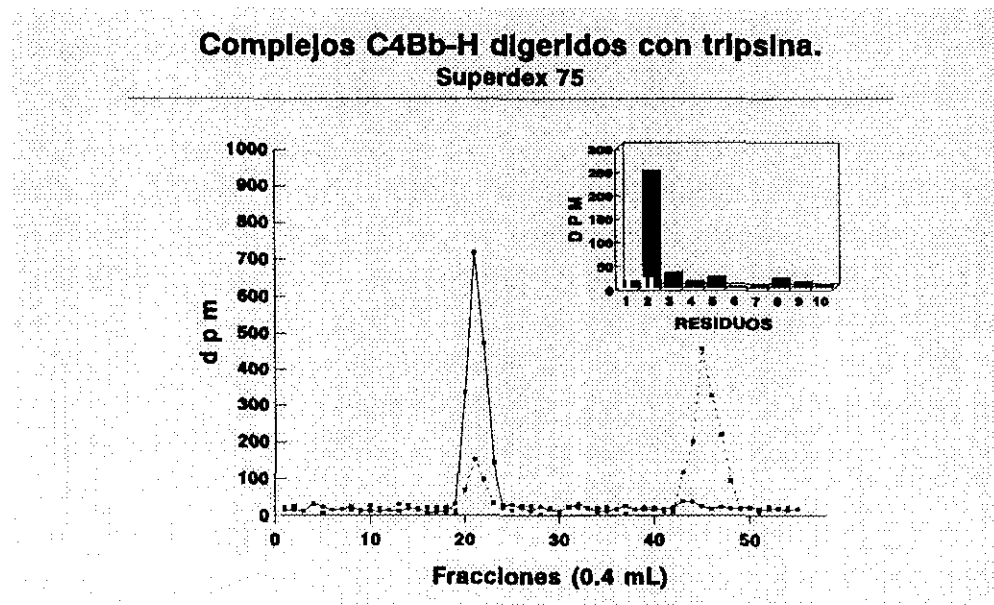


Figura 4.30. Complejo α_{trv} -H. Filtración en Superdex 75 del complejo α_{trv} -H sin tratar (—) y después del tratamiento con NH_4OH (· · ·). Recuadro interior: secuencia radioquímica del péptido liberado.

6. DETECCION Y CARACTERIZACION DE LOS COMPLEJOS COVALENTES ENTRE α' DE C4b Y EL DOMINIO C γ 3 DE LA IgG.

6.1. IMPLICACION DE UN FRAGMENTO DE 2.5 Kd DE LA CADENA α' DE C4b.

6.1.1. Digestión pepsínica de los complejos.

Una vez conocida la formación de complejos C4b-H, se imponía precisar el dominio responsable de dicha interacción, ya que Campbell et al.^[281], en un trabajo realizado con una mezcla de 80% de complejos con F(ab) $'_2$ y 20% de IC completos, indicaban la unión a la región Fd, sin considerar implicada la cadena L. Para ello, complejos iodo[1- 14 C]acetamida-C4b-IgG, formados durante la activación de la VC, son digeridos con pepsina (III.8.1.1), que fragmenta la IgG en la región F(ab) $'_2$ (cadena L, V $_H$, C γ 1 y región bisagra) y el pFc' (semejante al dominio C γ 3, ver 1.5). Tanto el sobrenadante como el precipitado se cargan en una PAGE-SDS en gradiente del 6-18% (III.6.3.1).

El análisis fluorográfico (figura 4.31) revela, en los ensayos (C4b-IC*C1) correspondientes a los precipitados -calles 1 (C4A), 3 (C4AB) y 10 (C4B)-, una ancha banda radiactiva a la altura de 31 Kd (F $_d$ + L), que se insinúa tenuemente en los controles (calle 6: C1*IC, sin C4; calle 9: C4*IC, sin C1) y no se detecta en los complejos no digeridos (calle 5- saturada por excesiva exposición). Al encontrarse marcada, debe pertenecer a un pequeño fragmento pepsínico de la cadena α' de C4b unido a L y, probablemente, a la región Fd (complejos α_{pep}' -L y α_{pep}' -Fd), como se discutirá más tarde (IV.7.2).

Al comparar los pocillos correspondientes a los sobrenadantes control (calle 7: C1*IC, calle 8: C4*IC), en los que aparece una banda radiactiva de 12 Kd correspondiendo al pFc' marcado inespecíficamente por el exceso de iodo[1- 14 C]acetamida-iodoacetamida no eliminada completamente en los lavados, con los ensayos (calle 2: C4A; calle 4: C4AB; calle 11: C4B), sorprendentemente, dos bandas extras, de 67 y 14 Kd se hacen patentes. La primera coeluye con la cadena β de C4 (lo que indicaría su resistencia a la digestión por pepsina en nuestras condiciones y su capacidad de captación de radiactividad de forma inespecífica), y la segunda podría estar formada por el mismo fragmento pepsínico de la cadena α' de C4b (α_{pep}') que forma los complejos α_{pep}' -L y α_{pep}' -Fd, pero enlazado al pFc' (α_{pep}' -pFc').

Otra banda con marcaje inespecífico se manifiesta a 45 Kd (OVA). La radiactividad justamente por debajo de la OVA no pudo ser asignada, quizá corresponda a dicha molécula que haya perdido un pequeño fragmento durante la digestión.

Es interesante hacer notar que en los ensayos con C4B, la cantidad de C4 utilizada fue el doble que en los otros porque se había sugerido que su unión a IC era menor que la de C4A^[198, 199].

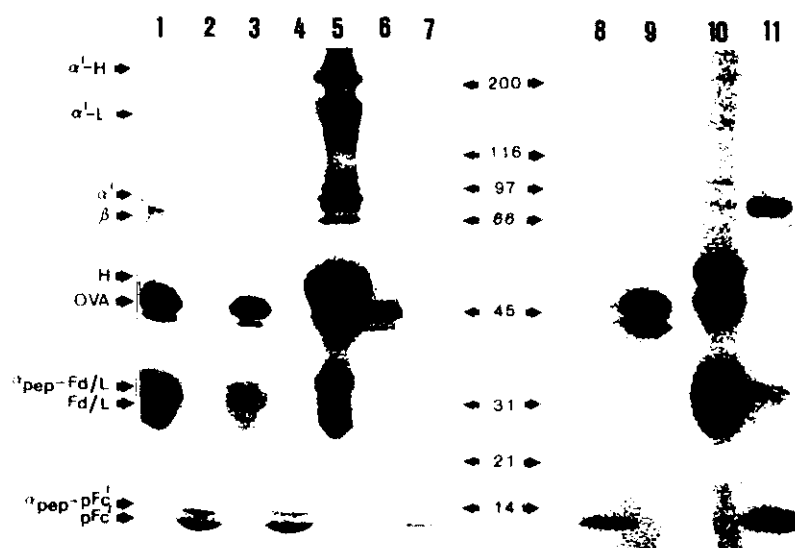


Figura 4.31. Autorradiografía de los complejos de interacción digeridos con pepsina. 1-3-10: precipitados de los complejos de interacción formados con C4A, C4AB y C4B, respectivamente; 2-4-11: sobrenadantes de los ensayos anteriores con C4A, C4AB y C4B; 5-ensayo de interacción sin digerir con pepsina; 6-7: precipitado y sobrenadante de ensayos en ausencia de C4; 8-9: sobrenadante y precipitado de ensayos en ausencia de C1.

6.1.2. Digestión pepsínica de C4: cinética.

Diseñamos el experimento para descartar que la banda de 14 Kd corresponda a un fragmento de C4b que quedase atrapado en la red de IC y se liberara al sobrenadante tras la digestión pepsínica. Iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4 (III.7) es sometido a una cinética enzimática recogiendo alícuotas a distintos tiempos de la digestión pepsínica (III.8.1.2), que, posteriormente, se cargan en una PAGE-SDS en gradiente del 6-18% (figura 4.32).

Dos aspectos son significativos:

1. Las cadenas α y γ sufren una degradación muy intensa con la aparición de múltiples fragmentos de tamaño decreciente a lo largo de la incubación.

2. β apenas es digerida en nuestras condiciones de estudio. Este dato confirma la posibilidad de que corresponda a la banda radiactiva de 67 Kd en la figura 4.31.

El revelado fluorográfico destinado a comprobar la extensión de la digestión en la zona del tioéster, nos muestra que la banda radiactiva desaparece a los 90 min de añadir la enzima, al generarse pequeños fragmentos que no son visibles en el gel. Estos resultados pueden interpretarse como que la banda de 14 Kd no pertenece a la cadena α de C4, a no ser que al quedar atrapada en la malla del inmunoagregado, ocultara y protegiera los puntos de rotura pepsínicos. Para descartar esta duda diseñamos el experimento siguiente (6.1.3).

Hay que anotar que entre los fragmentos radiactivos aparecidos a los 30 min, aparece una banda de alrededor de

43 Kd de peso molecular aparente, que probablemente corresponda a un segmento de la cadena α semejante a la región C4d. Las dos bandas superiores corresponden a α y α' todavía sin digerir.

6.1.3. Electroforesis bidimensional de los complejos de interacción formados con C4B y digeridos con pepsina.

Dos complejos de interacción formados con C4B (iodo[1- 14 C]acetamida-C4Bb-IgG) son

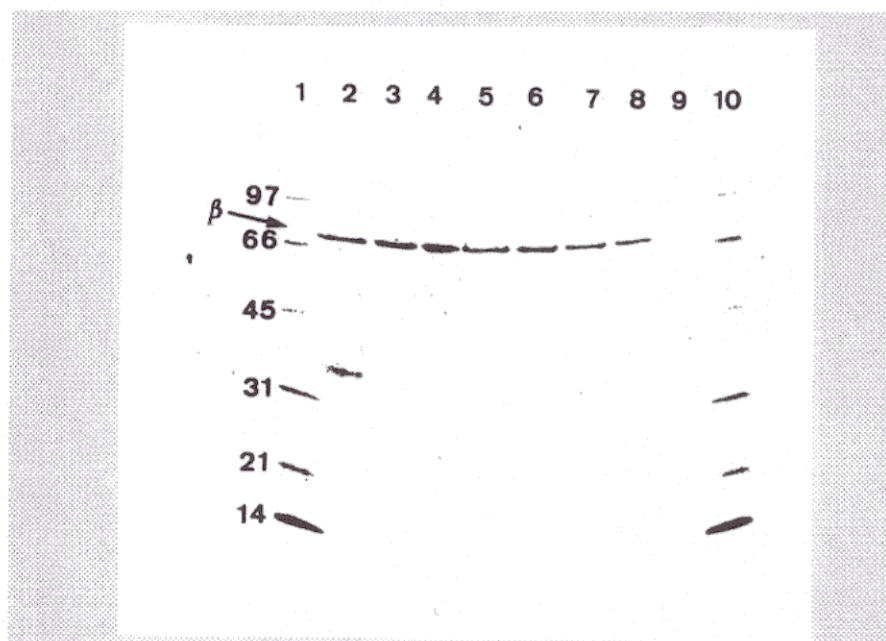


Figura 4.32. Cinética de la digestión pepsínica de C4. PAGE-SDS en gradiente del 6-18%. 1 y 10: patrones de peso molecular; 2-8: muestras de la digestión recogidas a 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8 y 24 h.

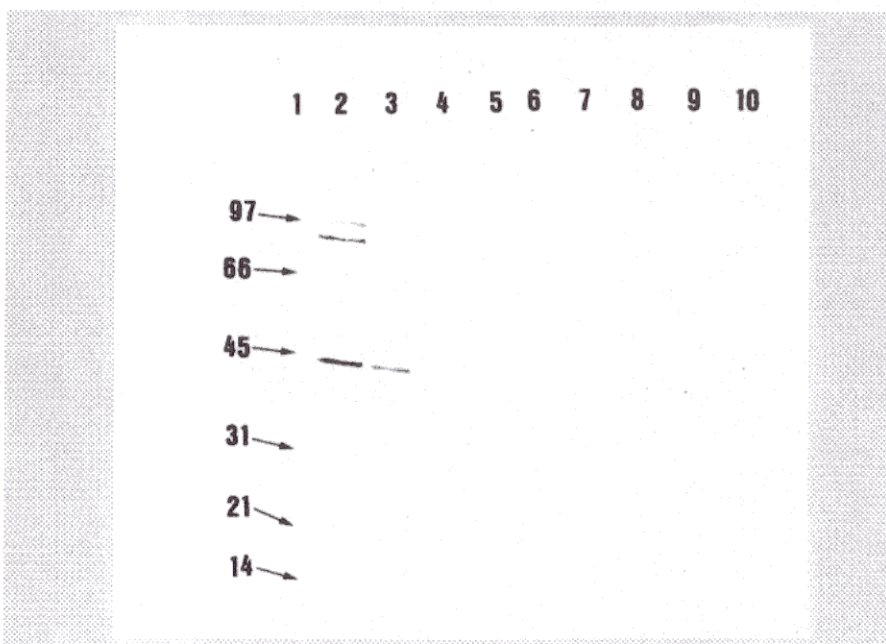


Figura 4.33. Cinética de la digestión pepsínica de C4. Fluorografía del gel anterior.

digeridos con pepsina. Una vez separados sobrenadante y precipitado, se desarrolla una PAGE-SDS bidimensional en gradiente del 6-18% con la segunda dimensión tras el tratamiento con NH_2OH (III.6.3.3). Como control, se procede de la misma manera, pero sustituyendo la NH_2OH por tampón de muestra electroforética.

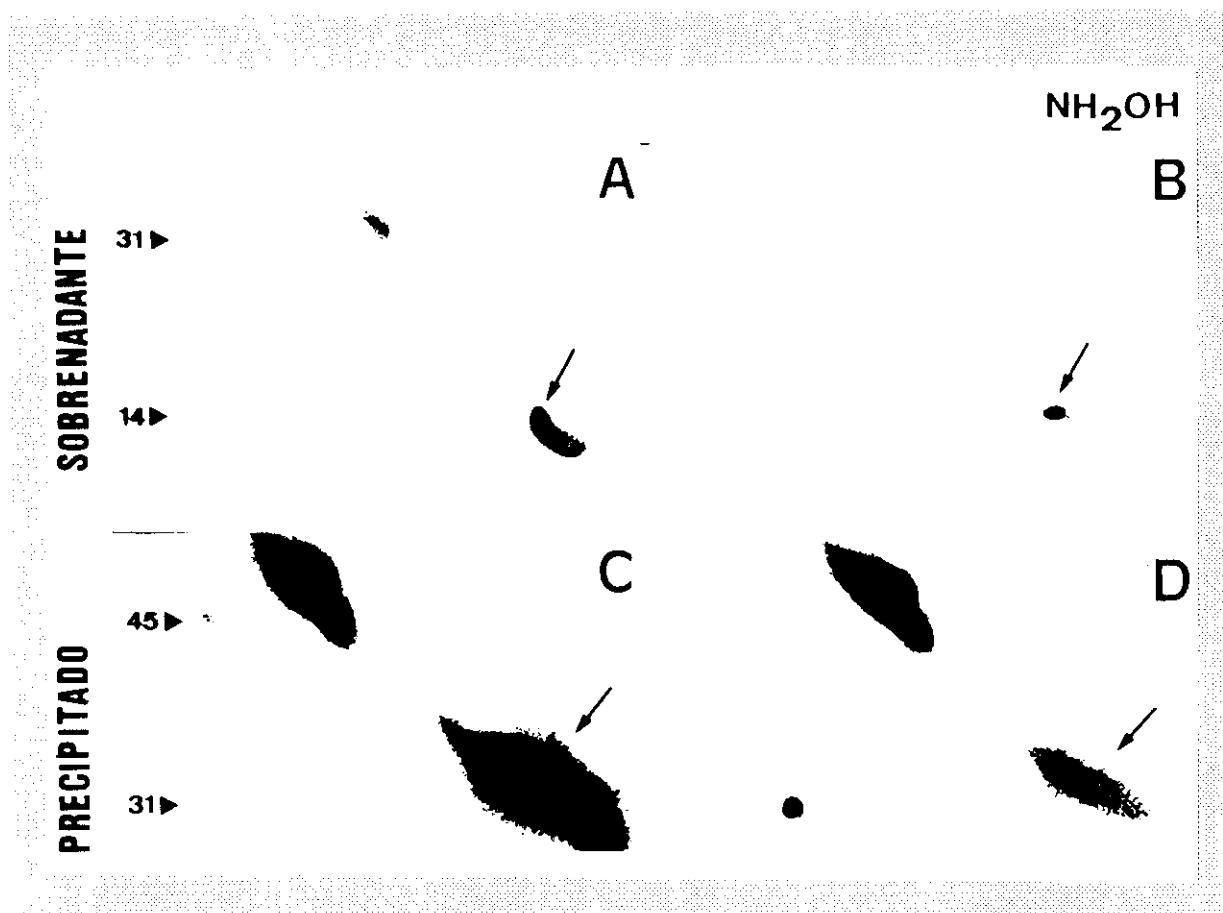


Figura 4.34. Fluorografía de la PAGE-SDS bidimensional de los complejos iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4Bb-IgG digeridos con pepsina. A-C: sobrenadante y precipitado controles sin NH_2OH ; B-D: sobrenadante y precipitado después del tratamiento con NH_2OH .

El análisis fluorográfico detecta:

- en los sobrenadantes ensayo (figura 4.34.B) una sensible pérdida de marcaje de la mancha de 14 Kd con respecto a su control (figura 4.34.A). La reducción del marcaje inespecífico en relación con la primera dimensión es difícil de explicar. Quizá el exceso de iodo[1- ^{14}C]acetamida que acompaña al pFc' no se encuentre covalentemente unido a Cys, sino simplemente sea arrastrado por él durante la electroforesis. Si es así, al incubarse durante más de 2 h la tira del gel para realizar la 2ª dimensión, se desprendería. Otra posibilidad, es que un fragmento de muy pequeño tamaño de C4 se uniera al pFc', liberándose con NH_2OH . Este supuesto complejo estaría enmascarado en la banda de 31 Kd por ser muy ancha.

- cuando los precipitados ensayo (figura 4.34.D) se comparan con el control (figura

4.34.C), una gran reducción en el marcaje se aprecia. En este caso tenemos un claro elemento de referencia que nos demuestra la eficacia del tratamiento: en los dos geles la banda de 45 Kd (OVA) no altera su radiactividad.

El conjunto de datos sugieren la formación de complejos $\alpha_{\text{pep}}'-L$ (posiblemente $\alpha_{\text{pep}}'-Fd$) en el precipitado y $\alpha_{\text{pep}}'-pFc'$ en el sobrenadante, con la liberación, por NH_2OH , de un péptido de 2-3 Kd de la cadena α' de C4. No podemos descartar que el péptido de 2-3 Kd provenga de una rotura secundaria por NH_2OH en las dos cadenas de la IgG (cadena L y C γ 3) y sea el mismo liberado por ambas cadenas en los experimentos de digestión tróptica (IV.5).

6.1.4. Caracterización y purificación de un péptido radiactivo de 2.5 Kd en iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4 digerido con pepsina.

El paso siguiente parecía claro. Era necesario determinar si el péptido pepsínico de iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4 tenía 2-3 Kd. Iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4 (III.7) se digiere con pepsina (III.8.1.2) durante 24 y 48h.

Luego se realizan dos pasos cromatográficos de purificación previos a la secuencia radioquímica.

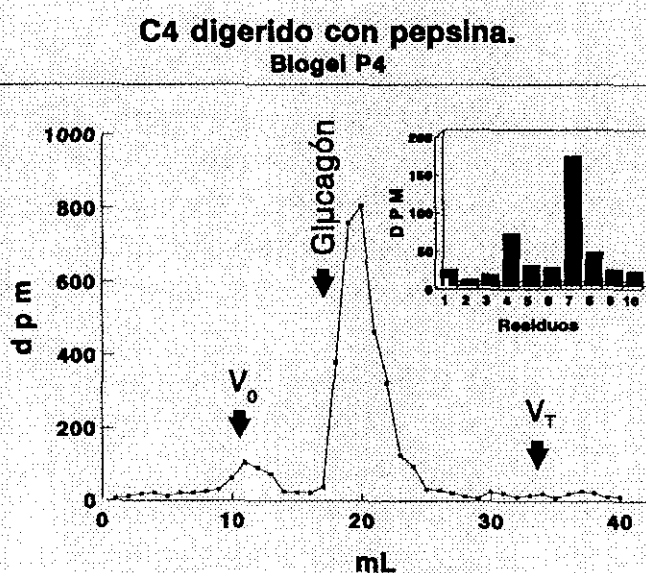


Figura 4.35. Perfil cromatográfico de ^{14}C -C4 digerido con pepsina en un Biogel P4. Recuadro: secuencia radioquímica del pico. V_0 : Vol. de exclusión; V_T : Vol. total.

- filtración en gel en Biogel P4 con un volumen de exclusión (V_0) de 4 Kd (III.9.1). En el perfil cromatográfico (figura 4.35) se observa un ancho pico radiactivo dentro del volumen de exclusión de la columna, que al compararse con el volumen de elución del glucagón (3 Kd) nos

permite asignarle 2.5 Kd (ζ es el péptido liberado de los complejos por NH_2OH ?).

100 μL de las fracciones que eluyen entre 17 y 24 mL, se mezclan y liofilizan, para ser sometidas a secuenciación radioquímica (recuadro interior de la figura 4.35). El análisis de la secuencia nos aporta dos ciclos marcados, el 4 y el 7, indicando la presencia de al menos dos péptidos pepsínicos distintos de la cadena α , de un peso molecular similar. Estos datos coinciden con los aportados en nuestro laboratorio para C3 en la misma zona de la molécula^[286]. Trasladados los resultados a las secuencias conocidas, las roturas en C4

($\text{---GVASL...LRL...PRGC}^*\text{GEQTM---}$) se producen en los enlaces $\text{Leu}^{984}\text{-Leu}^{985}$ y $\text{Leu}^{987}\text{-Pro}^{988}$, mientras que las de C3 ($\text{---RLKHL...IVT...PSGC}^*\text{GEQNMI---}$) ocurren entre la $\text{Leu}^{1003}\text{-Ile}^{1004}$ y $\text{Thr}^{1006}\text{-Pro}^{1007}$.

- fraccionamiento por HPLC. Con intención de estudiar el grado de heterogeneidad, iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4 es nuevamente digerido con pepsina. Una alícuota es cromatografiada en el Biogel P4,

mientras que el resto se redigiere 24 h más (total 48 h). La fracción cromatografiada es, a su vez, subdividida en dos partes antes de liofilizarse: una de ellas se secuencia radioquímicamente y la otra se repurifica en una columna $\mu\text{Bondapak C18}$ en un sistema HPLC (III.9.1.2). El perfil cromatográfico (figura 4.36) muestra el desdoblamiento del

HPLC de ^{14}C -C4 digerido con pepsina

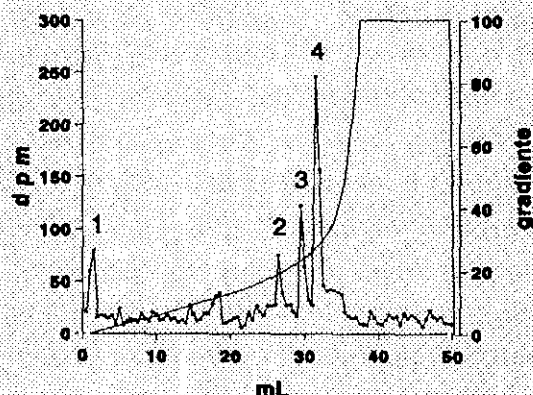


Figura 4.36. Perfil cromatográfico de $\mu\text{Bondapak C18}$ en un sistema HPLC de los péptidos radiactivos del Biogel P4 (figura 4.35).

muestra el desdoblamiento del pico inicial del Biogel P4 en 4 picos radiactivos, que se analizan por secuencia radioquímica (figura 4.37). El pico 1, que aparece excluido en la cromatografía, no presenta radiactividad en los 15 ciclos analizados, estimándose como iodo[1- ^{14}C]acetamida libre.

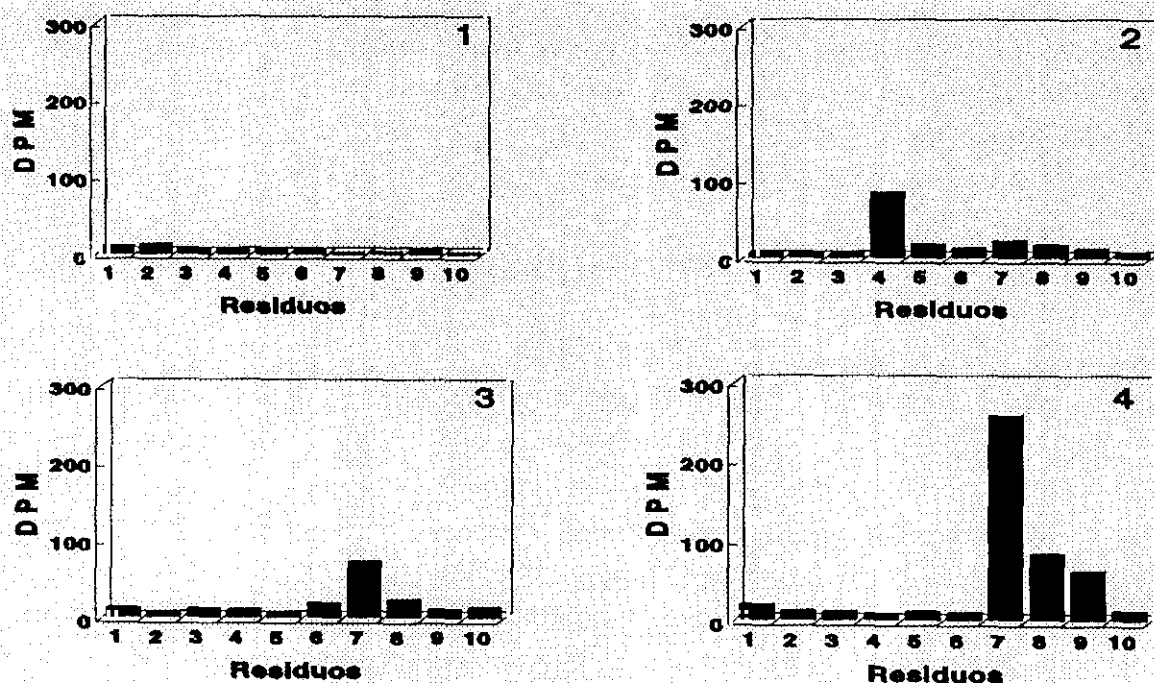


Figura 4.37. Diagrama de la secuencia radioquímica de los picos obtenidos en la figura anterior.

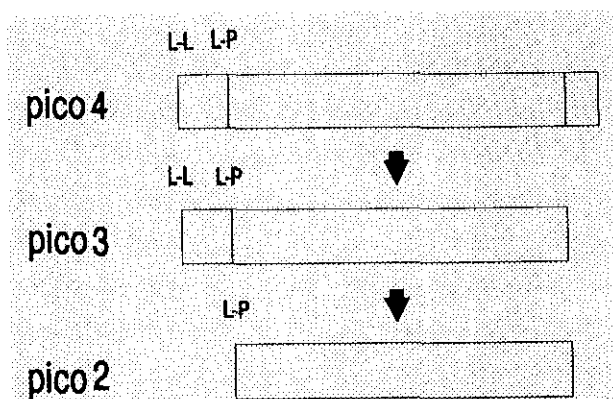


Figura 4.38. Hipótesis de la secuencia de digestión pepsínica de ^{14}C -C4 en la región del tioéster.

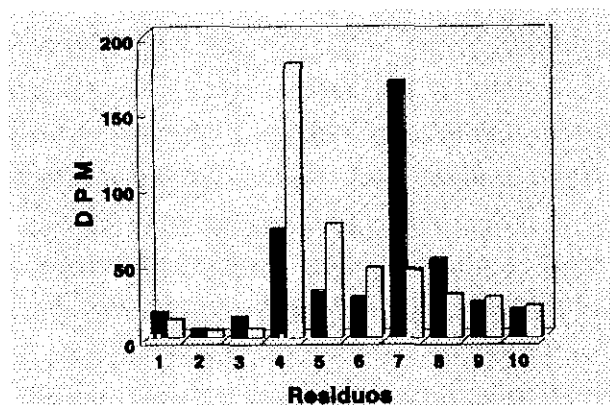


Figura 4.39. Diagrama de la secuenciación radioquímica de ^{14}C -C4 digerido con pepsina. 24 h (blanco); 48 h (negro).

El pico 2 presenta marcaje en el ciclo 4 (enlace hidrolizado Leu-Pro), mientras que los picos 3 y 4 lo hacen en el ciclo 7 (enlace Leu-Leu), concordando con el marcaje global obtenido antes de la recromatografía, donde la mayor radiactividad corresponde a la posición 7 (figura 4.36, recuadro interior). Deducimos por lo tanto, una heterogeneidad en la rotura por pepsina de la cadena α en la región que contiene el tioéster, tanto en el N-terminal como en el C-terminal. Si los tres picos correspondieran a solamente tres péptidos distintos, podría establecerse un orden de prioridad en la digestión (figura 4.38): un fragmento mayoritario, largo, con marcaje en 7 (posiblemente el péptido del pico 4 que por su elución podría ser más grande que el del pico 3) que daría lugar al corto con marcaje en 7 (pico 3), para en la digestión completa quedar reducido al más corto (pico 2). Todo quedaría invalidado si el pico 2 contuviera más de un péptido radiactivo, no pudiéndose diferenciar su longitud C-terminal.

Como conclusión, la pepsina, en nuestras condiciones de trabajo, produce al menos tres roturas alternativa tanto a nivel N-terminal como C-terminal que desaparecen después de redigerir 24 h más (figura 4.39), generando un péptido más corto con el residuo del ciclo 4 radiactivo.

6.2. IMPLICACION DEL DOMINIO C γ 3 DE LA IgG.

6.2.1. Purificación y secuencia radioquímica del péptido liberado por NH_2OH de los complejos formados en el precipitado y el sobrenadante de las digestiones pepsínicas de los iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4Bb-IgG.

Conocido el fragmento α_{pep} , considerábamos oportuno estudiar si formaba parte de los complejos de interacción tras la digestión pepsínica. Las muestras obtenidas en el apartado IV.6.1.1 con C4B, independientemente el sobrenadante y el precipitado, se someten a una filtración en gel en Biogel P4 (III.3.9.1). La columna fue previamente calibrada con OVA (45 Kd) y DNP-Lys (Sigma^R).

El perfil radiactivo del sobrenadante (figura 4.40) muestra: a) un pico en el volumen

de exclusión (V_0) que contendrá α_{pep}' -pFc', pFc' (banda de 12 Kd) marcado de forma inespecífica, así como la banda de 67 Kd (cadena β); b) un ancho pico con fragmentos de α' (eluyen entre 18-23 mL, como aparece en la figura 4.35) y posibles complejos entre péptidos del Cy2 y α_{pep}' ($V_E = 14-18$ mL); c) un pico estrecho de iodo[1- ^{14}C]acetamida libre ($V_E = 24-25$ mL), que se adelanta al volumen total (V_T) porque la DNP-Lys interacciona levemente con el gel, retardando su salida.

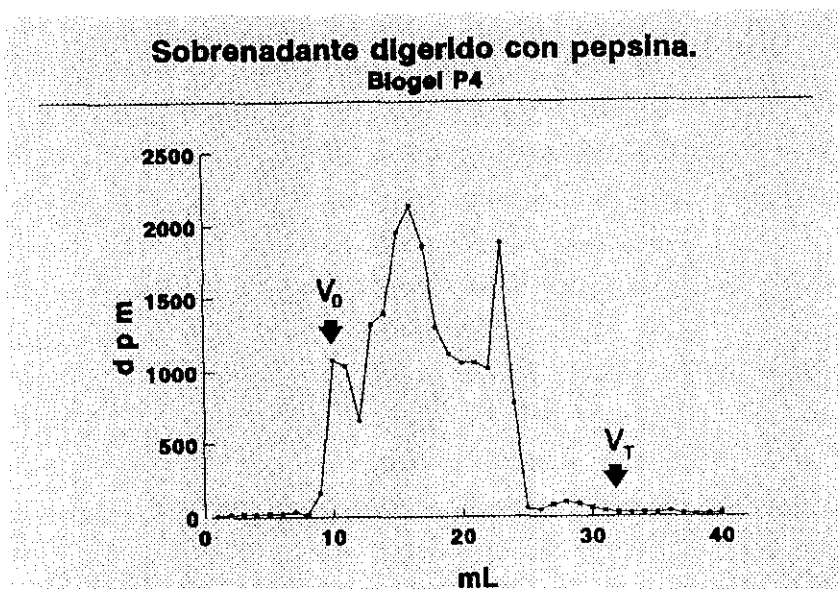


Figura 4.40. Biogel P4. Cromatografía de α_{pep}' -pFc'. Previo al tratamiento con NH_2OH .

En el precipitado, solamente aparece un pico con radiactividad, constituido por la banda de 45 Kd (OVA) y los complejos α_{pep}' -L/ α_{pep}' -Fd.

Las fracciones radiactivas (α_{pep}' -L/ α_{pep}' -H, en el precipitado y, α_{pep}' -pFc' más la cadena β y OVA, en el sobrenadante) obtenidas en V_0 (entre 9 y 13 mL, gráficas 4.40 y 4.42 línea punteada), se liofilizan y se tratan con NH_2OH para recargarse, subsecuentemente, en la misma columna. Como esperábamos, un nuevo pico radiactivo (fragmento escindido por NH_2OH), aparece con un $V_E = 18-23$ mL (figuras 4.41 y 4.42 línea continua). Estos dos picos coinciden con el del péptido procedente de la cadena α de C4 pepsinizada (α_{pep}'), un argumento a favor de su pertenencia a C4 (figura 4.35).

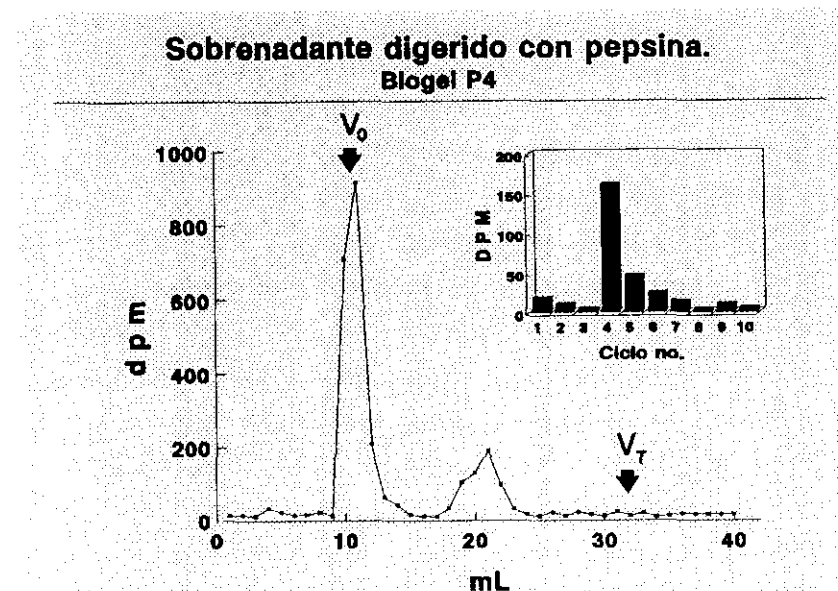


Figura 4.41. Biogel P4 Cromatografía de α_{pep}' -pFc'. Tras el tratamiento con NH_2OH . Recuadro: secuencia radioquímica del pico liberado..

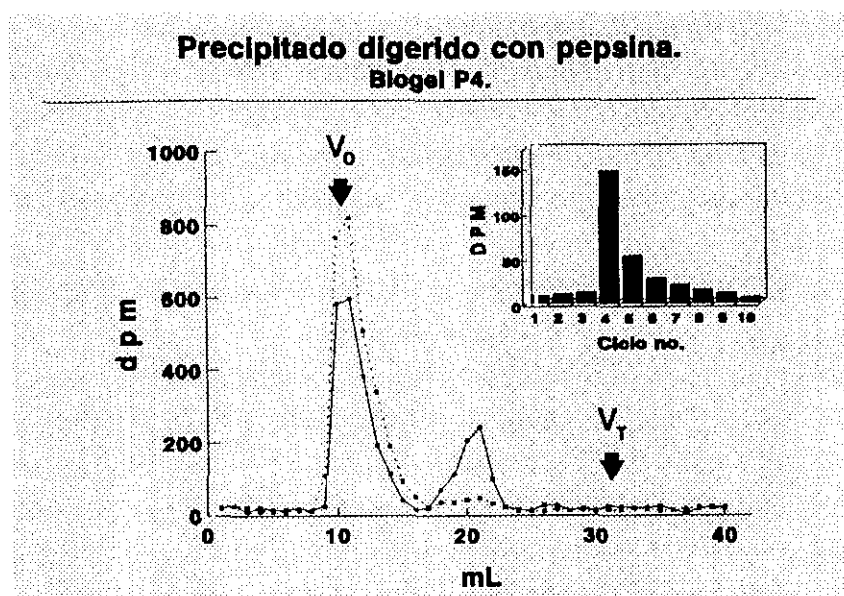


Figura 4.42. Biogel P4. Cromatografía de $\alpha_{\text{ppep}}'\text{-L/Fd}$. (---): Antes de tratar con NH_2OH ; (—): Tras tratar con NH_2OH . Recuadro: secuencia.

molecular (marcados en posición 7). La ausencia de radiactividad en el ciclo 7 en los péptido

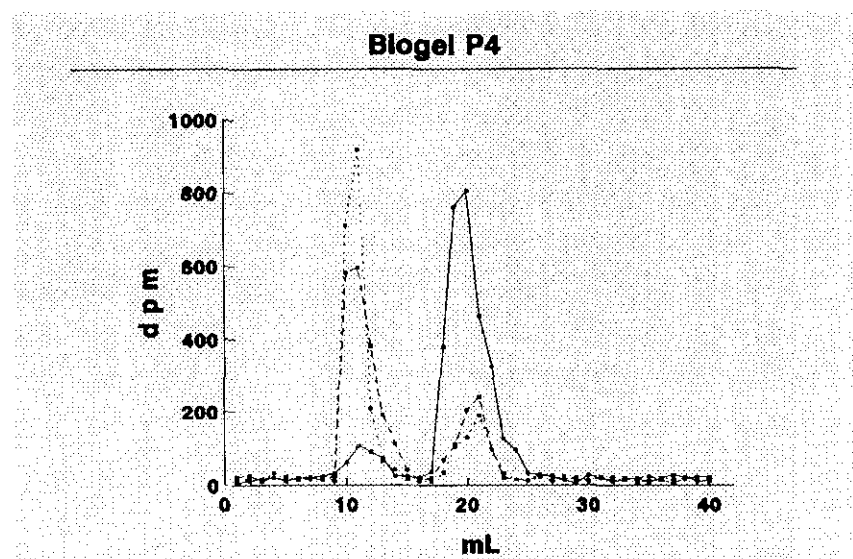


Figura 4.43 Solapamiento de las filtraciones en gel de las gráficas 4.35, 4.41 y 4.42. (—): α_{ppep}' ; (---): $\alpha_{\text{ppep}}'\text{-L/Fd}$; (···): $\alpha_{\text{ppep}}'\text{-pFc}'$.

encontrado, en las respectivas secuencias, enlaces susceptibles a hidrólisis por NH_2OH próximos a Cys que incorporen el ^{14}C , por lo que esta posibilidad nos parece poco probable.

Que el péptido pepsínico de 2.5 Kd desprendido por NH_2OH de $\alpha_{\text{ppep}}'\text{-pFc}'$ y $\alpha_{\text{ppep}}'\text{-L/Fd}$ es un fragmento de la cadena α' con el tioéster incorporado se deduce de las siguientes premisas:

- eluye en la misma posición que α_{ppep}' por filtración en gel (figura 4.43).
- incorpora iodo[1- ^{14}C]acetamida, que por secuencia radioquímica aparece en el ciclo

2 (digestiones con tripsina, figuras 4.29 y 4.30, recuadros interiores) o en el ciclo 4

Su secuencia radioquímica reveló radiactividad únicamente en el ciclo 4 (figuras 4.41 y 4.42, recuadros interiores), pero no en el 7. Al comparar el perfil cromatográfico de las tres gráficas solapadas (figuras 4.43), se aprecia como el pico mayoritario de α_{ppep}' (línea continua) se adelanta ligeramente a los otros dos, que coeluyen, indicando la presencia de péptidos de mayor peso molecular (marcados en posición 7). La ausencia de radiactividad en el ciclo 7 en los péptido liberados por NH_2OH de $\alpha_{\text{ppep}}'\text{-pFc}'$ y $\alpha_{\text{ppep}}'\text{-L/Fd}$ se deberá, posiblemente, a una mejor accesibilidad del enzima sobre C4b anclado a la superficie del IC.

No es descartable que los péptidos liberados provengan, en el sobrenadante, de roturas secundarias en la cadena β , y en el precipitado, de un péptido de la banda de 45 Kd. No hemos

(digestiones pepsínicas, figuras 4.41 y 4.42, recuadros interiores), como el péptido de C4.

- no es posible que se trate de dos fragmentos de la IgG (en L y en H) hidrolizados por NH_2OH , porque en todas las secuencias el marcaje aparecería en el mismo ciclo.

Cuando íbamos a dar por zanjados los resultados, "C4 se une al Cy3 durante la activación de la VC", nos asaltó una duda, que no por poco probable, era imposible. En ningún experimento habíamos descartado que la banda de 14 Kd estuviera constituida por α_{pep}' y un fragmento pepsínico de 12 Kd de la cadena L o de la región Fd. Por ello se intentó buscar una prueba directa de la implicación del dominio Cy3.

6.2.2. Inmunoblotting de los digeridos pepsínicos con suero anti-Fc.

Tras una PAGE-SDS en gradiente del 6-18 %, las bandas son trasferidas a membranas de nitrocelulosa (III.11) y reveladas con un suero anti-Fc marcado con peroxidasa (figura 4.44), utilizando como control positivo pFc' parcialmente purificado (calle 1).

En la calle 2 (figura 4.44 ampliada), el sobrenadante de la digestión pepsínica, se hicieron patentes, además de H (presente por error de pipeteo), varias bandas: a) 14 Kd, correspondiente a α_{pep}' -pFc', b) 12 Kd, el propio pFc', c) bandas de pequeño peso molecular, posiblemente fragmentos del Cy2 no detectados en geles (recordamos que la pepsina digiere intensamente este dominio).

La calle 3 (precipitado de la digestión con α_{pep}' -L/Fd), nos sirve de control negativo. Solamente aparece un banda nítida (cadena H) y trazas de pFc' que quedaron atrapadas en la malla de $\text{F(ab)}_2'$. Como era natural, no se revela ni la cadena L ni el Fd.

La banda de 14 Kd que se marcaba con iodo[1- ^{14}C]acetamida-C4 y se desprendía tras el tratamiento con NH_2OH , ahora se revela con anti-Fc, indicando que está constituida por α_{pep}' y el pFc'.

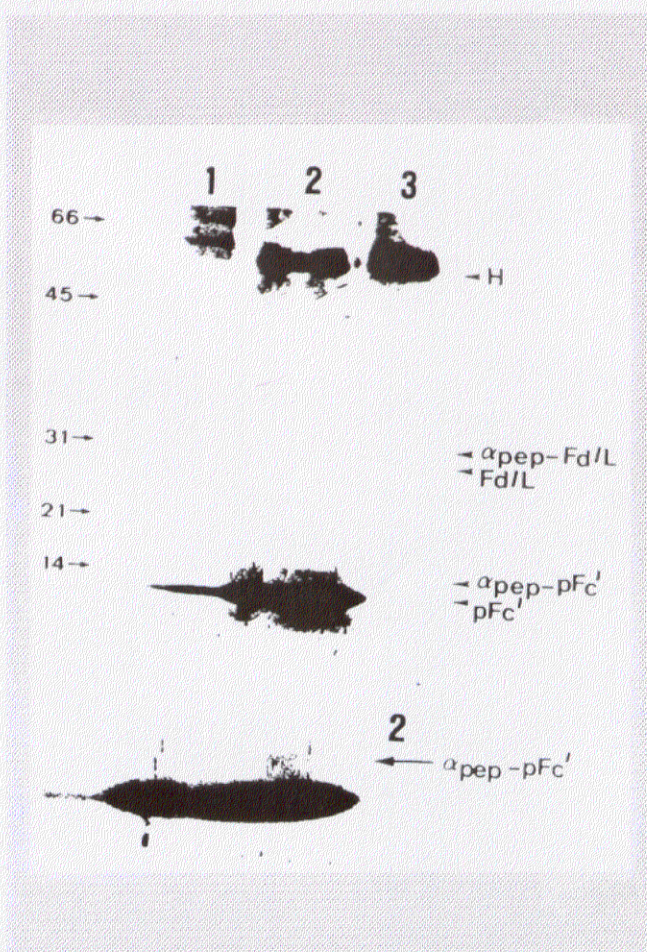


Figura 4.44 Inmunoblotting de una digestión pepsínica de complejos C4Bb-IgG revelada con suero anti-Fc. 1. pFc' parcialmente purificado; 2. sobrenadante (ampliado debajo); 3. precipitado.

Como el experimento no se realiza en fase fluída, sino con las proteínas en estado desnaturalizado, cabría la remota posibilidad (el Fd/L no son reconocidos por el anticuerpo, calle 3), de que la banda de 14 Kd correspondiera al Fd o a la cadena L y se revelara por reacción cruzada, debido a la gran homología de los dominios de la IgG. Para descartarlo se diseñaron los dos experimentos siguientes.

6.2.3. Inmunoprecipitación con suero anti-Fc.

Dos ensayos de interacción con iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4, tras ser digeridos con pepsina, se inmunoprecipitan con suero anti-Fc (IV.12) y se someten a una PAGE-SDS en gradiente del 6-18% (3 mm de grosor). Después del tratamiento fluorográfico, el gel (azul) y la placa revelada (negro) se solapan en la fotografía para mostrar mejor los complejos (figura 4.45). Como controles positivos se utilizan el sobrenadante (calle 4) y el precipitado (calle 3) de ensayos digeridos no inmunoprecipitados.

Justo por encima del pFc'(azul), en los pocillos inmunoprecipitados (calles 1 y 5) se observa una banda negra (¹⁴C) a la altura de 14 Kd, coincidente con la que aparece en el ensayo sin inmunoprecipitar (calle 4). Así corroboramos los resultados del experimento anterior: la banda radiactiva por encima del pFc' porta un fragmento del Fc.

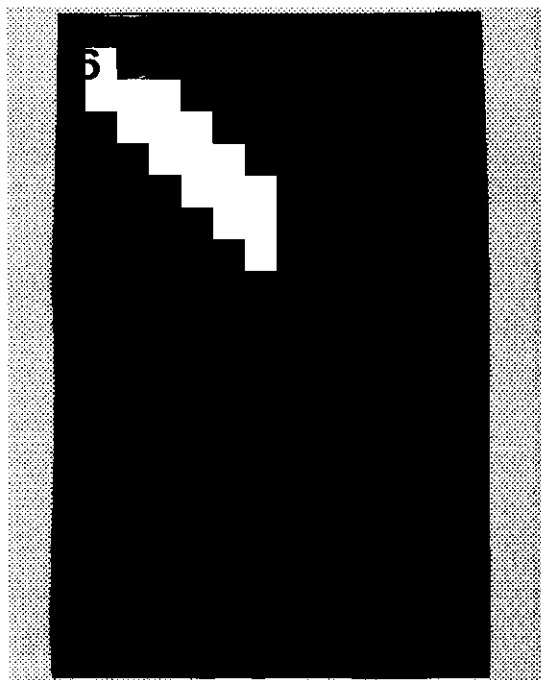


Figura 4.45. Inmunoprecipitación con anti-Fc. 1 y 5. sobrenadante inmunoprecipitado; 2. patrones; 3. precipitado de C4Bb-IgG digerido con pepsina; 4. sobrenadante de 3; 6. ensayos 1 y 5 no inmunoprecipitado.

Las bandas azules, no radiactivas, de las calles 1 y 5, son las cadenas del AC inmunoprecipitante, desprendidas de las bolas de Sepharosa durante la ebullición.

6.2.4. Filtración en gel de los sobrenadantes de la digestión pepsínica de los complejos de interacción C4Bb-IgG.

Basándonos en la propiedad de dimerización del Cy3^[278], diseñamos un experimento de filtración en gel en Superdex 75 (III.9.2.3) como método de aislamiento de α_{pp}' -pFc', lo que excluiría, definitivamente, la participación de un fragmento del F(ab)₂' en la banda de 14 Kd. La columna, previamente calibrada con patrones de peso molecular conocido según se comenta en materiales y métodos, se carga con los sobrenadantes de las digestiones pepsínicas de 4 complejos iodo[1-¹⁴C]acetamida-C4Bb-IgG.

En el perfil cromatográfico (figura 4.46) se dibujan dos picos estrechos y nítidos (I y II), de 50 y 24 Kd, que por PAGE-SDS en gradiente del 6-18% (figura 4.46, recuadro interior) corresponden al $F(ab)'_2$,

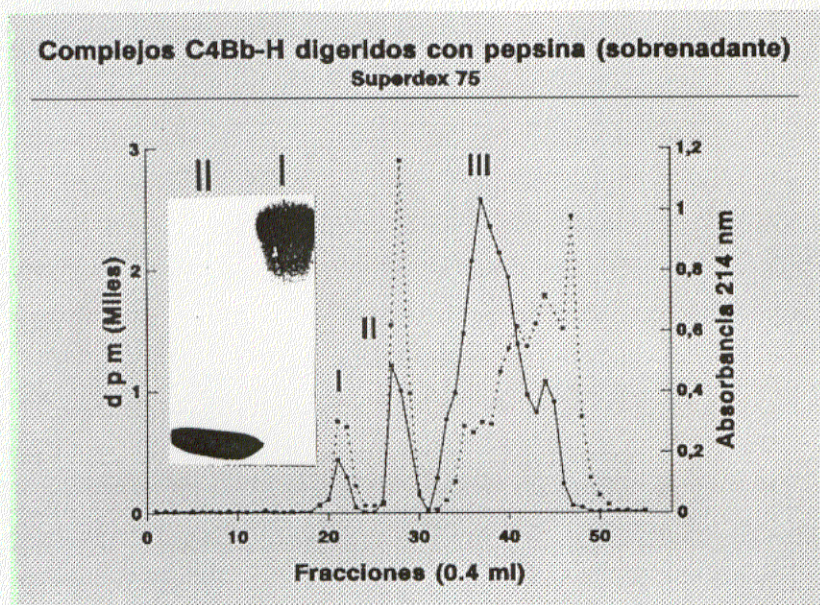


Figura 4.46. Perfil cromatográfico en Superdex 75 de las digestiones pepsínicas de los complejos ^{14}C -C4Bb-IgG. (—) dpm; (• • •) A_{214} ; Recuadro interior: PAGE-SDS de los picos I y II.

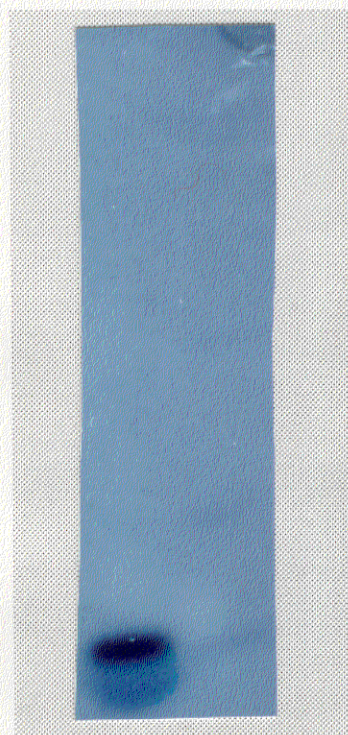


Figura 4.47 Solapamiento de PAGE-SDS y fluorografía del pico II del Superdex 75.

desdoblados en L y Fd (I) al ser en condiciones reductoras, y al pFc' (II). Junto a ellos, una serie de picos con péptidos del $C\gamma_2$ de bajo peso molecular, que se aproximan al V_T de la columna. El análisis radiactivo de las fracciones cromatográficas nos define 4 picos: I. eluye en la rama ascendente del de 50 Kd; II. eluye una fracción delante del de 28 Kd; III. muy mayoritario, anterior a la zona de absorbancia, con un hombro al final del pico principal.

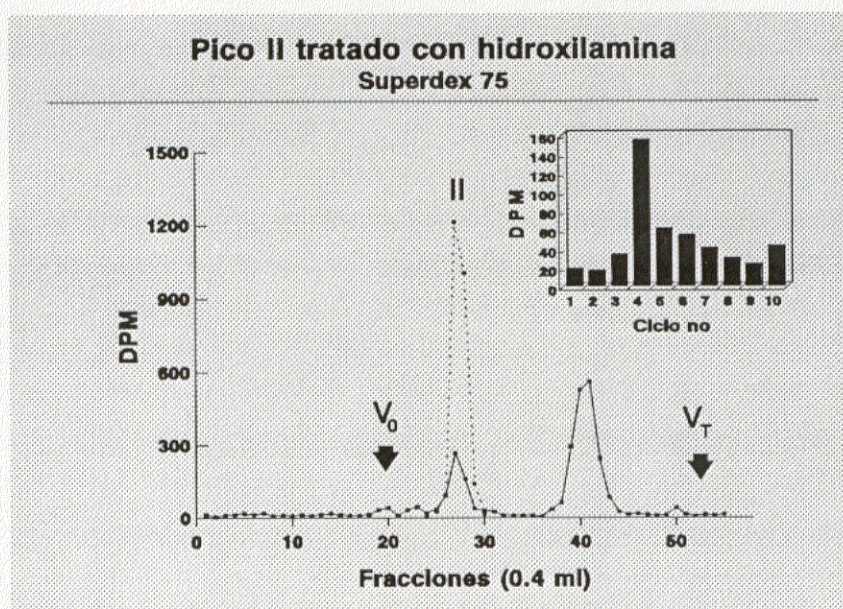


Figura 4.48. Recromatografía en Superdex 75 del pico II. (—) después del tratamiento con NH_2OH ; (• • •) previo al tratamiento con NH_2OH ; Recuadro interior: secuencia radioquímica del pico desplazado.

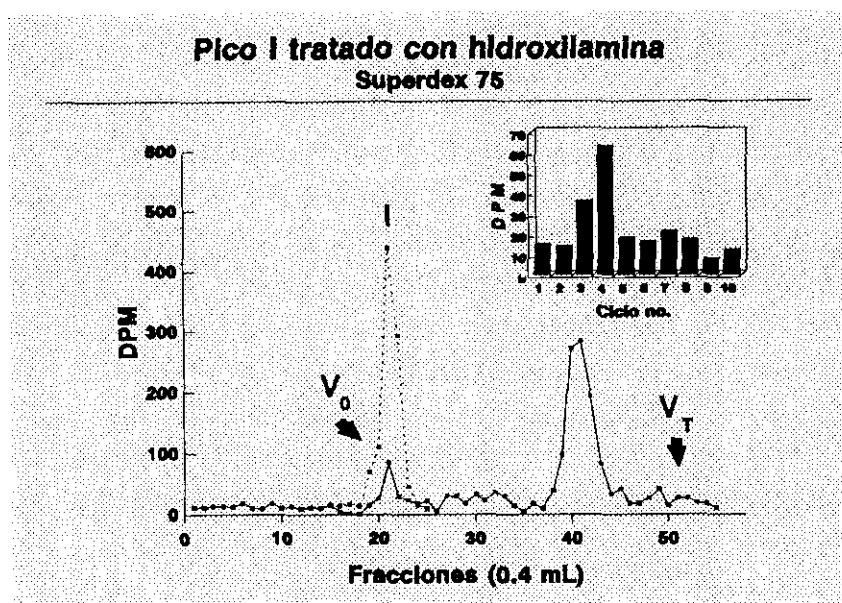


Figura 4.49. Recromatografía en Superdex 75 del pico I. (—) después del tratamiento con NH_2OH ; (· · ·) previo al tratamiento con NH_2OH ; recuadro interior: secuencia radioquímica del pico desplazado.

tratada con NH_2OH , se recarga en la misma columna (figura 4.48). El 70.5% de la radiactividad se desplaza a las fracciones 37-44. La secuencia radioquímica (figura 4.48, recuadro interior) con marcaje en el ciclo 4, nos afirma que se trata del mismo péptido liberado en IV.6.2.

Como control y confirmación de la formación de complejos $\alpha_{\text{pep}}'-\text{F(ab)'}_2$, se repite la experimentación con el pico I (figura 4.49). Los resultados son semejantes a los anteriores. El 80.4% de la radiactividad se desplaza a las fracciones 38-44 y el análisis radioquímico muestra marcaje en el ciclo 4 y muy levemente en el 7.

De estos datos se deduce la formación de complejos de interacción entre C4B (extrapolables a C4A por la figura 4.31) y la IgG de conejo tanto en la región F(ab)'_2 como en el dominio Cy3.

7. COMPLEJOS DE INTERACCION CON OTRAS ZONAS DE LA IgG.

7.1 ESTUDIOS PREVIOS DE UNION DE C4 AL DOMINIO Cy2.

Al comparar el número de dpm de los sobrenadantes de las digestiones pepsínicas de los ensayos de interacción con las dpm correspondientes al complejo $\alpha_{\text{pep}}'-\text{pFc}'$ (banda de 14 Kd en la gráfica 4.31), notamos una gran diferencia. En principio la asignamos a péptidos de la cadena α' de C4Bb atrapados en la red de IC o desprendidos del complejo durante la digestión, pero al analizar los perfiles cromatográficos de las figura 4.40 y 4.46, observamos

Para comprobar si II es el complejo $\alpha_{\text{pep}}'-\text{pFc}'$, 200 μl de las fracciones 26-29 se mezclan, se dividen en dos alícuotas y se liofilizan. Con la primera de ellas se desarrolla una PAGE-SDS en gradiente del 6-18% (figura 4.47). En azul se tiñe el pFc' , mientras que en negro, 2 Kd por encima, se aprecia la banda $\alpha_{\text{pep}}'-\text{pFc}'$.

La segunda alícuota, después de ser

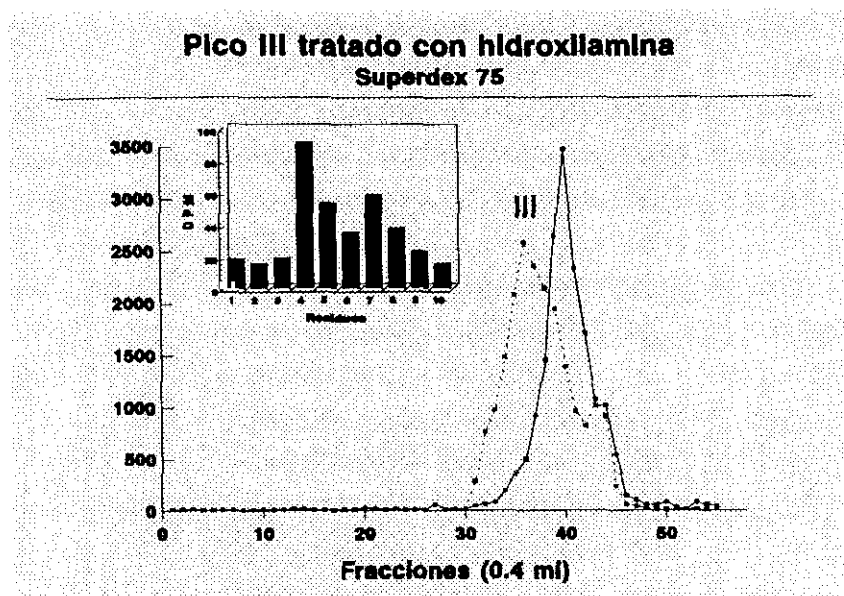


Figura 4.50. Recromatografía en Superdex 75 del pico III. (—) después del tratamiento con NH_2OH ; (• • •) previo al tratamiento con NH_2OH . Recuadro interior: secuencia radioquímica de una mezcla de las fracciones

que el último pico radiactivo no eluía en las mismas fracciones que α_{pep}' . Entonces decidimos, mezclar 50 μl de las fracciones 30 a la 34 (figura 4.46), liofilizarlas y analizar su secuencia radioquímica (figura 4.50, recuadro interior). Como esperábamos, el marcaje fundamentalmente aparece en el ciclo 4, aunque es sensible el ciclo 7.

Como estos datos podían ser el preludio de

nuevos sitios de interacción, mezclamos las fracciones 30-45 y tras su liofilización se trataron con NH_2OH (figura 4.50). Se advierte un desplazamiento de la radiactividad desde las fracciones 30-45 hacia la 34-45 (volumen de elución de los picos I -figura 4.48- y II -figura 4.47- desplazados por NH_2OH), aunque los dos picos permanezcan solapados (el tratado y sin tratar), sugiriendo la presencia de complejos entre α_{pep}' y péptidos de pequeño tamaño. En este punto de la investigación, no podemos precisar con exactitud si pertenecen a la degradación pepsínica del dominio Cy2 o por el contrario son péptidos de degradación del pFc'. En el siguiente apartado veremos que esta posibilidad es improbable pues la cantidad de radiactividad desplazada es mayor que la formadora de enlaces α_{pep}' -pFc'. Por otro lado, hemos iniciado experimentos de digestión con papaína, no mostrados en este trabajo, que indican que el marcaje de los supuestos complejos α_{pep}' -Fc (dominios Cy2 + Cy3 + región bisagra) es mayor que el de α_{pep}' -pFc'. Estos trabajos se completarán con el aislamiento del dominio Cy2 por doble digestión: plasmina (obtención del fragmento F(acb)) y papaína (F(ab) + Cy2). Tampoco es probable que se trate de un péptido de α' hidrolizado por NH_2OH , ya que el punto de rotura peptídica entre la Asn¹³¹⁸-Gly¹³¹⁹ se encuentra alejado más de 300 residuos de la zona del tioéster que incorpora el marcaje.

7.2. UNION A LA REGION Fd.

Trabajos previos^[281], que no consideraban los complejos C4b-L, afirmaban que C4 se uniría a la región Fd, cuando lo que detectaban era complejos C4b-F(ab)'₂. Utilizando las técnicas cromatográficas descritas para la separación de la cadena L del fragmento Fd en medio ácido (1 M de ácido propiónico)^[302], en el que dimeriza el Fd, no hemos podido obtener los dos tipos de complejos. Quizá la presencia del Ag aumente la capacidad de agregación

de las cadenas del AC.

Para clarificar esta interacción, hemos diseñado una aproximación matemática, que tiene la ventaja de aportarnos una cuantificación de la formación de complejos a lo largo de las distintas regiones de la IgG.

En el apartado IV.5 (figura 4.28) realizábamos un análisis densitométrico en el que se mostraba como el 15.13% de los complejos eran $\alpha_{1\gamma}'$ -L, y el 84.87%, $\alpha_{1\gamma}'$ -H. Según estos datos

$$C4Bb-L \approx 15.13\% \text{ y}$$

$$C4Bb-Fd + C4Bb-C\gamma 2 + C4Bb-C\gamma 3 = 84.87\% \quad (4.1)$$

Estudiando las áreas del pico radiactivo II (figura 4.48) vemos que 2124 dpm forman complejos $\alpha_{1\gamma}'$ -pFc', de las que el 70.5% se liberan por NH_2OH . De forma semejante estudiamos las dpm desplazadas en el pico III (figura 4.51, área rayada), sobre la que se hacen dos correcciones.

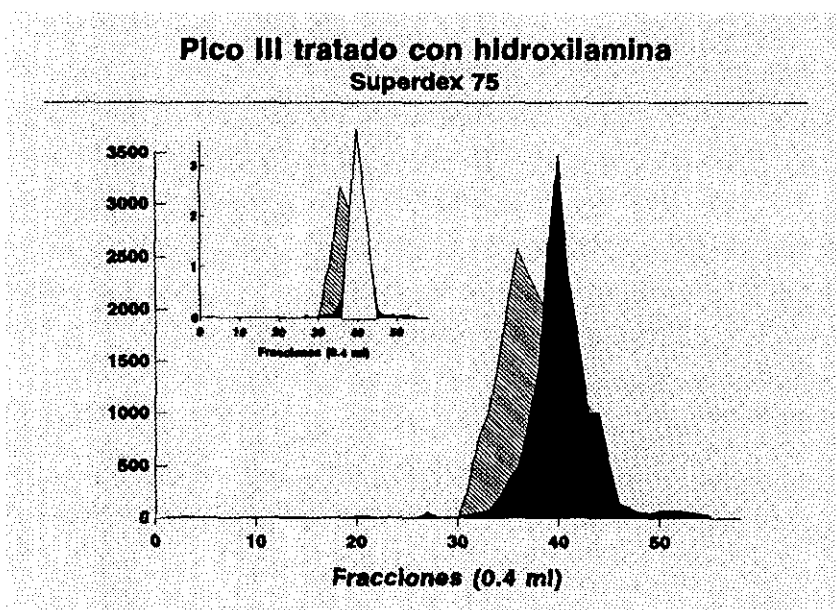


Figura 4.51. Figura anterior representando las áreas. En el recuadro interior se aprecia el reajuste para equilibrar las áreas antes y después de tratar con NH_2OH .

1ª. Mientras que el área del pico III previo al tratamiento con NH_2OH corresponde a 19565 dpm, después de utilizar el reactivo, desciende a 15642. Para equilibrar ambos valores, se diseña un triángulo semejante al del área tras el tratamiento, pero con 19565 dpm, considerando la relación área sin NH_2OH /área tras NH_2OH = $19565/15642 = 1.3435$. Su raíz cuadrada nos proporciona la razón de los lados, 1.1591, que nos permite dibujar un nuevo triángulo (figura 4.51, recuadro interior). El cálculo del área desplazada ($\triangle ABED$) se verifica como sigue (figura 4.52):

siendo $\triangle DEC$ el solapamiento de $\triangle ABC$ y $\triangle FEC$, $\triangle ABED$ es la diferencia entre $\triangle ABC$ y el $\triangle DEC$, correspondiendo a 8385 dpm.

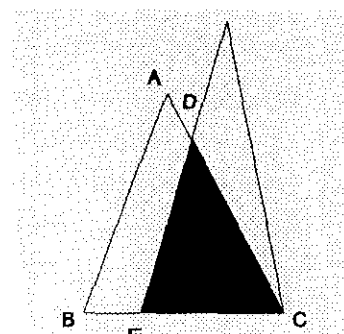


Figura 4.51. Esquema para el cálculo de las dpm liberadas por NH_2OH del complejo $\alpha_{1\gamma}'$ -pFc'.

2ª. Como la eficacia de la hidrólisis es del 70.5%, el número de dpm corregidas para

el complejo $\alpha_{\text{pep}}'\text{-Cy2}$ será 11893, con un cociente $\alpha_{\text{pep}}'\text{-Cy2}/\alpha_{\text{pep}}'\text{-Cy3} = 5.6$. Si sustituímos estos valores en (4.1), obtenemos

$$\text{C4Bb-Fd} + 6.6 \text{ C4Bb-Cy3} = 84.87\% \quad (4.2)$$

Para buscar una relación entre C4Bb-Fd y C4Bb-pFc', recurrimos al densitometrado de dichos complejos en las calles 10 (precipitado) y 11 (sobrenadante) de la figura 4.31. Los complejos $\alpha_{\text{pep}}'\text{-L/Fd}$ resultan ser el 92.23% del total, quedando el 7.77% para $\alpha_{\text{pep}}'\text{-pFc'}$, por lo que

$$\text{C4Bb-Fd} + \text{C4Bb-L} = 11.87 \text{ C4Bb-Cy3}$$

Como $\alpha_{\text{pep}}'\text{-L}$ era el 15.13%, podemos escribir

$$\text{C4bB-Fd} + 15.13 = 11.87 \text{ C4Bb-Cy3} \quad (4.3)$$

Entre las fórmulas (4.2) y (4.3) se establece un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas cuya resolución es

$$\text{C4Bb-Fd} = 49.15\% \text{ y } \text{C4Bb-Cy3} = 5.41\%.$$

Si la relación $\alpha_{\text{pep}}'\text{-Cy2}/\alpha_{\text{pep}}'\text{-Cy3} = 5.6$, los complejos C4Bb-Cy2 son el 30.31%. Todos estos datos se resumen en la tabla.

Tabla. 4.8. Porcentajes de formación de complejos.

Complejos		%
Con la cadena L		15.13
Con la cadena H	Fd	49.15
	Cy2	30.31
	Cy3	5.41

V.CONSIDERACIONES FINALES

V. CONSIDERACIONES FINALES.

Los isotipos de C4 son capaces de formar complejos covalentes (éster con C4B y amidas con C4A), electroforéticamente diferenciables en geles de bajo reticulado, con distintas zonas de la IgG OVA-antiOVA durante la activación de la VC "in vitro" con componentes aislados.

A la vista de los resultados expuestos, pueden establecerse, con mayor o menor grado de verosimilitud, tres hipótesis:

1. Funcional monovalente.
2. Estructural.
3. Múltiple escalonada.

1. Funcional monovalente. Consiste en la presencia de un sólo sitio de unión covalente real, que ejerciera todas las acciones del C en la interacción con ICs. Con los datos de que disponemos actualmente, no es totalmente descartable esta posibilidad. Podría existir un aminoácido o mejor un grupo de ellos cercanos entre sí, como sitio aceptor primario, quedando el resto de las zonas de interacción relegadas a simples uniones inespecíficas, no funcionales, debidas a la alta reactividad del carbonilo procedente del tioéster.

Una mirada detenida a los resultados obtenidos en este trabajo (tabla 4.8), mostrando altos porcentajes de formación de complejos en la mayoría de los dominios, hace poco plausible esta posibilidad. Si acaso, habría que considerarla, de un modo especial, en aquellas moléculas destinadas a la formación de las convertasas de la VC, como se discutirá más adelante.

En el caso de que fuera correcta, es lógico pensar, que el residuo o la zona (hay que considerar que C4B forma enlaces éster -figura 24.A-, pero que C4A, prefiere amidas -figura 23.A-, por lo que no es posible considerar un solo aminoácido en la formación del complejo covalente) de interacción estaría altamente conservada en las distintas especies, pero no se encontraría en la IgM, ya que no se detectan complejos covalentes C4b-IgM, a pesar de activar C por la VC^[303]. Esta premisa no es totalmente cierta, pues podrían encontrarse los mismos residuos, pero ser inaccesibles al carbonilo activado, por restricciones estéricas o funcionales.

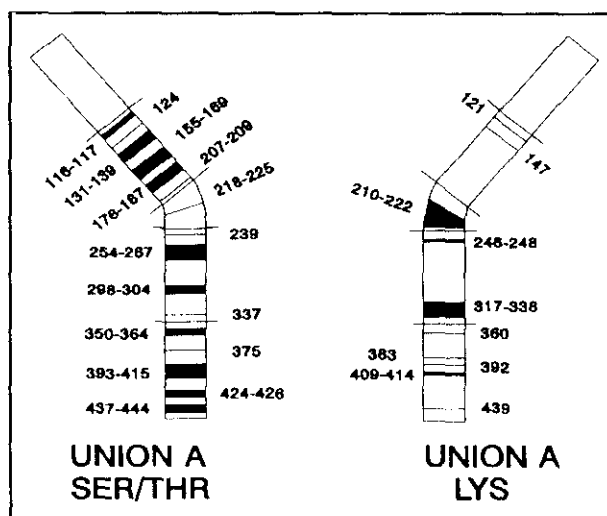


Figura 6.1. Esquema de los posibles puntos de interacción de C4 con la cadena H. Teoría funcional monovalente.

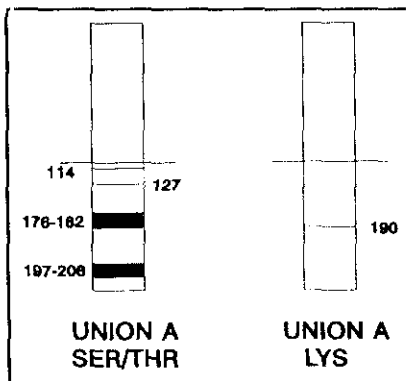


Figura 6.2. Esquema de los posibles puntos de interacción con la cadena L. Teoría funcional monovalente.

Al solapar las secuencias de las regiones constantes de las cadenas H de la IgG1 humana y de la IgG de conejo 16 grupos o residuos capaces de formar enlaces éster y 9 zonas con Lys (amidas) se detectan (figura 5.1). Igualmente, en la confrontación de las cadenas L(κ) aparecen 4 grupos Ser/Thr y solamente conservada la Lys¹⁹⁰. Un estudio más profundo y la comparación con las regiones constantes de la IgM, sería demasiado complejo y las deducciones muy aventuradas.

2. **Estructural.** Considerando la gran homología tridimensional de los dominios de las inmunoglobulinas, el sitio aceptor, podría estar constituido por una zona de estructura secundaria o terciaria común a las distintas regiones de la IgG. Esto explicaría los múltiples complejos detectados en este estudio, tanto en el $F(ab)'_2$ como en el F_c , aunque no solucionaría las discrepancias en los porcentajes de unión.

En este punto es interesante destacar, que la predicción de estructura secundaria, por el método de Chou, P. Y. & Fasman, G. D.^[304], de los isotipos de C4, revela en la zona de diferenciación isotípica un giro β en C4A, ausente en C4B^[305], sin grandes diferencias en los perfiles hidropáticos. Esto indica, que de alguna manera no conocida todavía, la estructura tridimensional de las moléculas de C4 interviene, de forma importante, en la formación del

Tabla 6.1. Solapamiento de las secuencias de los dominios de la IgG de conejo.

C ₁	Pro-Val-Ala-Pro-Thr-Val-Leu- Ile-Phe-Pro-Pro- Ala-Ala-Asn-Gln-Val- Ala-Thr-Gly-Thr-Thr-----
Cy1	Ser- Gly- Thr-Lys- Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Ala-Pro- Cys-Cys -Gly-Asp-Thr-Pro-Ser-Ser-Thr-Val-
Cy2	Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-
Cy3	Gly-Asp-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys-Val-Tyr-Thr-Met-Gly-Pro-Pro-Gln-Asp-Gln-Leu-Ser-Ser-Arg-Ser-Val-
	♦ ♦ ♦ ♦ ♦
C ₁	Val- Ile-Val- Cys - Val-Ala-Asx-Lys-Tyr-Phe-Pro- Asp-Val-Thr-Val-Thr-Ser- Glx-Val-Asp-Gly-Thr-Trp-
Cy1	Thr-Leu-Gly- Cys -Leu-Val-Lys-Gly-Tyr-Leu-----Pro-Glu-Pro-Val-----Thr-Val-Thr-Trp-
Cy2	Glu-Val-Thr- Cys - Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-----Glu-Asp-Asp-Pro-Glu-Val-Glx-Phe-Thr-Trp-
Cy3	Ser-Leu-Thr- Cys -Met-Ile-Asp-Gly-Phe-Tyr-----Pro-ser-Asp- Ile-----Ser-Val-Gly-Trp-
	♦
C ₁	-----Val-Ser- Glx-Asp-Gly-Thr-Thr- Ile- Glx-Ser-Lys- Ile-Ser-Glx-Asp-Ser-Asp-Asp-
Cy1	Asn-Ser-Gly-Thr-Leu-----Thr-----Asp-Gly-Val-Arg-Thr-Phe-Pro-Ser-Val-Arg-Gln-Ser-Ser-Gly-Leu-
Cy2	Tyr-Ile-Asx-Asp-Glu-----Gln-----Val-Arg-Thr-Ala-Arg-Pro-Pro-Leu-Arg-Glu-Gln-Gln-Phe-Asp-Ser-
Cy3	Glu-Lys-Asp-Gly-Lys-Ala-Glu-Asp-Asp-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Ala-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Trp-
	♦ ♦ ♦ ♦ ♦
C ₁	Cys -Thr-Tyr-Leu-Ser-Ser-Thr-Leu-Thr-Leu-Thr-Ser-Thr-Glx-Tyr-Asp-Ser-His-Lys-Glx-Tyr-Thr- Cys -
Cy1	Tyr-Ser-Val-Pro-Ser-Thr- Val-Ser- Val-----Ser-----Glx-----Pro-Pro-----Ser-Thr- Cys -
Cy2	Thr- Ile-Arg-Val- Val-Ser- Thr-Leu- Pro- Ile-Thr-His-Glu-Asp-Trp-Leu-Arg-Gly-Lys-Glu-Phe-Lys- Cys -
Cy3	Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Ser-Val- Pro-----Thr-Ser-Glu-----Trp-Glx-Arg-Gly-Asp-Val-Phe-Thr- Cys -
	♦ ♦ ♦ ♦ ♦
C ₁	Lys-Gly-Thr-Val-Lys-Glx- Ser-Thr-Gly-Thr-Val- Val-Glx- Ser-Phe-Asx-Arg-Gly-Asx- Cys
Cy1	Asn-Val-Ala-----Thr-Asn-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Thr-Val- Ala-Pro- Ser-Thr- Cys -Asp-Lys-
Cy2	Lys-Val-His-Asp-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala- Pro- Ile- Glu-Lys-Thr- Ile- Ser-Lys- Ala- Arg-
Cy3	Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr- Thr-Gln-Lys- Ser- Ile-Ser- Arg- Ser-Leu- Gly

◆ colocados debajo de los agrupamientos de Ser/Thr.

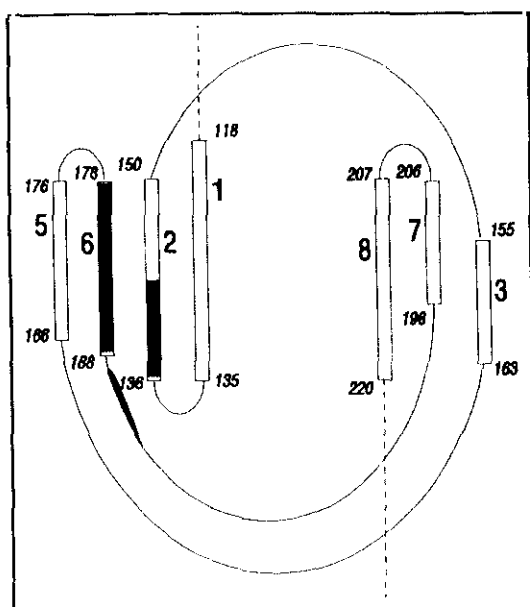


Figura 6.3. Proyección planar de la estructura secundaria del dominio Cy1⁽³⁰⁷⁾. Rellenados los agrupamientos Ser/Thr.

enlace, presentando ciertos epítomos o accediendo a zonas diferentes de la molécula aceptora.

Para verificar esta hipótesis, solapamos las secuencias de los diferentes dominios de la IgG de conejo (tabla 6.1), buscando zonas estructurales con presencia de Ser, Thr o Lys, que nos permitieran asignar una región tridimensional de interacción. No se localizan agrupamientos de Lys en ninguna zona con estructura secundaria semejante, por lo que, al menos para los enlaces amida de C4A, la teoría quedaría invalidada.

Contrariamente, dos agrupaciones muy notorias aparecen para Ser y Thr: una ocupa el comienzo de la segunda lámina β , previa a la Cys¹³⁴ en la cadena L y a las Cys^{144, 261, 367} en H

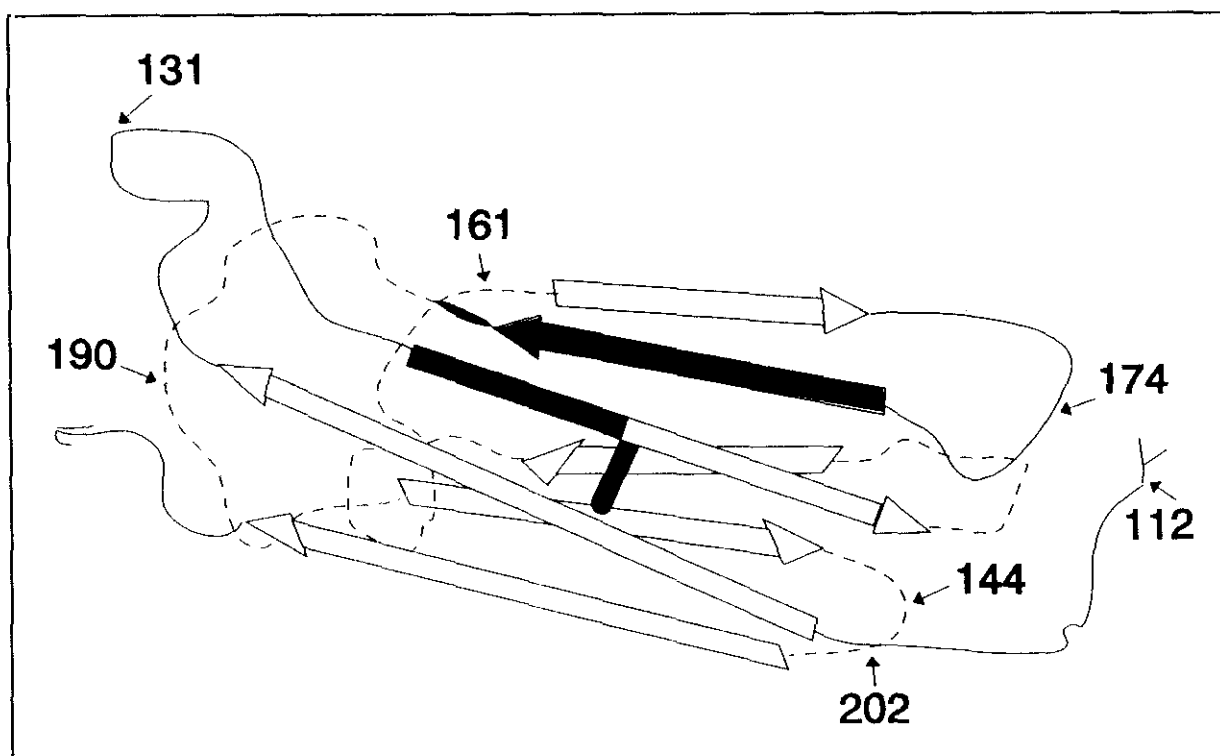


Figura 6.4. Estructura tridimensional del dominio Cy1. Rellenado el agrupamiento Ser/Thr.

(numeración Eu), formadoras de puentes disulfuro intracatenarios; mientras la otra se sitúa en la quinta lámina β , contigua a la anterior, y se continúa en la región de enlace con la lámina β sexta (figura 6.3). En conjunto delimitan una amplia región tridimensional como se aprecia en la figura 6.4. Solamente la Lys⁴⁰⁹ permanece en el interior de este agrupamiento.

3. Múltiple escalonada. Las uniones se producirían al azar distribuidas por toda la molécula gradualmente desde el punto de activación de C4. Debido a la corta vida media (μseg) del grupo carbonilo reactivo^[307, 308], la formación de complejos covalentes sería más numerosa en las cercanías del sitio de activación. Con los resultados obtenidos en este trabajo, parece la hipótesis más coherente. Según nos alejamos de las zonas de interacción de C1q con los ICs (C γ 2^[10]), la frecuencia con la que encontramos complejos disminuye (tabla 4.8).

Esta posibilidad viene apoyada por multitud de observaciones experimentales. Una proteína altamente relacionada con los componentes del C por poseer un tioéster interno, la α 2-macroglobulina^[309], forma enlaces con distintas Lys (amida) o Tyr (éster) de las proteasas atrapadas en su interior, aunque hay preferencia por determinados residuos, posiblemente los más cercanos tridimensionalmente al carbonilo reactivo en el momento de la transesterificación^[310]. Además, C3 forma, por activación de la VA, enlaces éster con distintos dominios de la IgG cuando constituye ICs precipitantes^[59, 286, 287], aunque con IgG agregada por calor (no fisiológica) solamente se detecta unión al Fd^[285], debida, probablemente, a que la distinta configuración de la red hace más accesibles unas regiones que otras.

No podemos olvidar, sin embargo, que nuestro sistema de trabajo es heterólogo (humano/conejo), lo que de alguna manera podría generar zonas de interacción no reales. Experimentos desarrollados en nuestro laboratorio^[312] siguiendo la misma metodología, pero con suero de conejo, demuestran para C3 semejantes zonas de interacción que las descritas aquí. Aun así, es posible, que en la IgG humana, el sitio de interacción sea único.

Para ilustrar la importancia de la distancia a la superficie aceptora, recordamos las diferencias en la unión y activación de C por los distintos isotipos de IgG^[8]. IgG1, con una región bisagra más corta que IgG3, y por consiguiente más cerca del aceptor, activa más C, a pesar de unir menos C1q por tener la región bisagra más corta.

¿ Cuales son las implicaciones biológicas de estas interacciones ? En un primer momento nos sentimos tentados a asignar a cada dominio acomplejado una funcionalidad concreta, pero un estudio molecular más detallado nos ofrece perspectivas muy diferentes. El análisis por difracción de neutrones de C4, nos muestra un elipsoide lamelar suma de C4c (8 x 2 x 18 nm) y C4d (4 x 2 x 9 nm)^[17], mientras que la IgG, por cristalografía de rayos X, tiene unas dimensiones aproximadas de 4 x 5 x 16 nm^[278], a las que se incorpora el esqueleto del antígeno. De acuerdo a estos datos, las dos moléculas interaccionantes son de tamaño similar, lo que nos lleva a pensar que cualquiera que sea el lugar de formación del complejo, repercutirá grandemente en toda la malla del inmunoagregado.

Tres son las principales funciones biológicas de estos complejos:

1. Intervención en el fenómeno de IIP^[69]. El papel desempeñado por C4 en este mecanismo parece ser pobre, encaminándose primordialmente a la formación de la C3 convertasa de la VC^[72, 74] y la generación de moléculas de C3. No es posible descartar, de todas formas, una acción disgregante ejercida por los complejos C4b-IgG^[72, 75], similar a la de C3b-IgG, aunque por su menor presencia cuantitativa, el efecto quede enmascarado.

2. Formación de las convertasas de la VC. La molécula de C4 que se une a la superficie aceptora (ICs o células) no tendría que tener una orientación definida, por lo que su capacidad múltiple de unión sería una gran ventaja del organismo a la hora de señalar el agente que tiene que eliminarse. En cambio, y es lo que diferencia a los activadores de los que no lo son, debe preservarse de los componentes reguladores del C y permitir la unión la C2, la subunidad enzimática. Quizá para esta función, la unión a un sitio específico y no al azar, que orientara la molécula en una dirección para bloquear la región de cargas negativas donde se une C4bp, sería definitiva para la continuación de la cascada. Además aseguraría la exposición al solvente del sitio de interacción con C3b^[36, 37] o C4b^[38] para, cambiando la especificidad, transformarse en la C5 convertasa.

La unión covalente o no de C4b^[36] a aminoácidos cercanos a la zona de activación por C1 puede cumplir las premisas anteriores y constituir una conformación tridimensional adecuada para generar las convertasas. En el caso de la VA, se ha conseguido el ensamblaje de una C3 convertasa activa sobre polisacáridos que impiden el reconocimiento por factor H, donde influye la estructura tridimensional del oligosacárido^[311].

3. Interacción con receptores de complemento para realizar el aclaramiento de los inmunoagregados de la circulación. Posiblemente, la misión fundamental de este sistema en relación a activadores no celulares. El principal receptor implicado es CR1 (CD35), que une C4b/C3b, con mayor eficacia cuando están agregados^[51, 52]. El revestimiento de los ICs con C4b/C3b implica necesariamente, de nuevo, un mecanismo de protección frente a los mecanismos reguladores o la presencia de células portadoras del receptor cercanas a la red Ag/AC en gran número, lo que suele suceder en los procesos inflamatorios.

La agregación vendría dada por el depósito covalente de C3b/C4b sobre C4b o la proximidad de dos o más complejos C4b-IgG en el entramado del inmunoagregado, lo que también podría actuar como mecanismo defensivo frente a las proteínas reguladoras al formarse una estructura multimolecular que impidiera estéricamente el acceso de los reguladores.

Como último aspecto funcional destacable, no podemos olvidar el papel regulador que ejercen tanto C3b como C4b nacientes sobre la activación de C1^[20], de importante relevancia fisiológica para prevenir la sobreactivación de la cascada. En este punto, son de vital trascendencia, las moléculas de C4 activadas (IV.3.5) que no son capaces de formar complejos de interacción.

Resumiendo: la teoría "estructural", que en principio, parece muy sugerente, pues más de la mitad de los residuos con capacidad de formar enlaces éster se agrupan en una zona espacial muy concreta, tiene como aspectos negativos los distintos porcentajes de unión a cada dominio de la IgG y la carencia de un agrupamiento similar para los residuos susceptibles de enlaces amida.

Si consideramos los múltiples puntos de unión de C4b a la IgG demostrados en este trabajo, la hipótesis más acorde sería la tercera (múltiple escalonada). Todas las moléculas ensambladas a la IgG tendrían carácter funcional: unas, las localizadas en zonas no protegidas del ataque de las proteínas reguladoras, actuarían desmembrando la red de ICs e impidiendo su precipitación, mientras que otras refugiadas, por su disposición tridimensional tras su anclaje al AC, de la escisión proteolítica, formarían, además, las convertasas de la VC. Por último, ambos grupos podrían unirse a receptores de C. No es necesaria la unión a un sólo sitio (teoría funcional monovalente) para que la molécula no quede al alcance de C4bp y factor I, ya que esto puede lograrse desde diferentes puntos de anclaje. A pesar de todo, no es descartable que en el hombre la zona de interacción esté más restringida.

Experimentos más detallados que están en curso, implicando a las regiones variables y concretando la interacción con el dominio Cy2, podrían confirmar la tercera teoría.

En conclusión, la interacción de C4b con ICs durante la activación de la VC "in vitro" se realiza en múltiples sitios de la molécula del AC, posiblemente de una forma escalonada, que depende de la presencia de residuos aceptores y de la vida media del carbonilo reactivo.

VI.CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1. El consumo de C4 durante la activación de la VC "in vitro" por ICs OVA-antiOVA es dependiente de la cantidad de C1, con tendencia a alcanzar un máximo (96%) cuando la proporción de μg de C1/ μg de ICs es 1.5.
2. En los complejos covalentes formados entre la cadena α' de C4 y la IgG solamente intervienen el 5.96% de las moléculas de C4.
3. Confirmamos en nuestro sistema experimental, que C4B es 3.7 veces más activo hemolíticamente, frente a eritrocitos de carnero sensibilizados, que C4A.
4. La cadena β de C4 es resistente al tratamiento con pepsina a pH 4.2 durante 24 h, mientras que α se digiere, en la zona del tioéster, a un péptido de 2,5 Kd.
5. En ensayos con ICs, C4A forma enlaces del tipo amida (no resistentes a NH_2OH) y C4B se enlaza mediante ésteres.
6. Los complejos formados con los dos isotipos de C4 son electroforéticamente diferenciables por geles de bajo reticulado.
7. **Se detecta la formación de complejos de interacción entre el grupo carbonilo reactivo liberado del tioéster oculto en la molécula nativa y la región F(ab)'_2 del AC, tanto a nivel de la cadena ligera, como del fragmento Fd.**
8. **C4b interacciona covalentemente con el fragmento pFc' (Cy3) de la IgG, y muy posiblemente con el dominio Cy2 .**

Para finalizar: C4 es una molécula de anclaje a las superficiesceptoras de la VC. En el caso de ICs, interacciona con múltiples zonas del AC a lo largo de toda su secuencia, probablemente dependiendo de la distancia desde el punto de su activación a las cadenas laterales de los residuos Ser, Thr (C4B) o Lys (C4A).

VII.BIBLIOGRAFIA

1. Vivanco F., (1990) Cien años de complemento. *Inmunología* **9**, 99-107.
2. Rother K. and Till G.O., (1988) The complement system. (Springer-Verlag), ed) Berlín.
3. Gigli, I.; Porter, R. R. and Sim, R. B. (1976) The unactivated form of the first component of human complement, C1. *Biochem. J.* **157**, 541-548.
4. Shelton, E.; Yonemashu, K. and Stroud, R. M. (1961) Ultrastructure of the human complement component C1q *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 65-68.
5. Reid, K. B. (1989) Chemistry and molecular genetics of C1q. *Behring Inst. Mitt.* **84**, 8-19.
6. Arlaud, G. J.; Thielens, N. M. and Aude, C. A. (1989) Structure and functions of C1r and C1s: current concepts. *Behring Inst. Mitt.* **84**, 56-64.
7. Law, S. K. A. & Reid, K. B. (1988) Complement. (IRL Press), ed) Male, D.
8. Bindon, C. I.; Hale, G.; Brüggemann, M. and Waldmann, H. (1988) Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J. exp. Med.* **168**, 127-142.
9. Tan, L. K.; Shopes, R. J.; Oi, V. T. and Morrison, S. L. (1990) Influence of the hinge region on complement activation. C1q binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 162-166.
10. Duncan, A. and Winter, G. (1988) The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**, 738-739.
11. Marqués, G.; Antón, L. C.; Barrio, E.; Sánchez, A.; Ruiz, M. S.; Gavilanes, F. and Vivanco F (1993) Arginine residues of the globular regions of human C1q involved in the interaction with immunoglobulin G *J. Biol. Chem* **268** (en prensa).
12. Doekes, G.; van-Es, L. A. and Daha, M. R. (1984) Binding and activation of the first complement component by soluble immune complexes: effect of complex size and composition. *Scand. J. Immunol.* **19**, 99-110.
13. Doekes, G.; Van Es, L. A. and Daha, M. R. (1982) Influence of aggregate size on the binding and activation of the first component of human complement by soluble IgG aggregates. *Immunology* **45**, 705-713.
14. Saint-Remy, J. M. R. (1984) Mechanism of activation of the classical pathway of complement by monoclonal IgE (DES). Restricted regulation of C4b by C4b-binding protein. *Eur. J. Immunol.* **14**, 254-259.
15. Yue-Hua, J.; Matsushita, M.; Okada, H.; Fujita, T. and Kawakami, M. (1988) The C4 and C2 but not C1 components of complement are responsible for the complement activation triggered by the Ra-reactive factor. *J. Immunol.* **141**, 4271-4275.
16. Okada, M. and Utsumi, S. (1989) Role for third constant domain of the IgG H chain in activation of complement in the presence of C1 inhibitor. *J. Immunol.* **142**, 195-201.

17. Perkins, S. J.; Nealis, A. S. and Sim, R. B.(1990) Molecular modeling of human complement component C4 and its fragments by X-ray and neutron solution scattering. *Biochemistry* **29**, 1167-1175.
18. Strang, C. J.; Siegel, R. C.; Phillips, M. L.; Poon, P. H. and Schumaker, V. N. (1982) Ultrastructure of the first component of human complement: electron microscopy of the crosslinked complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 586-590.
19. Ziccardi, R. J. & Cooper, N. R. (1979) Active disassembly of the first complement component C1 by C1-inactivator. *J. Immunol.* **123**, 788-792.
20. Ziccardi, R. J. (1986) Control of C1 activation by nascent C3b and C4b: a mechanism of feedback inhibition. *J. Immunol.* **136**, 3378-3383.
21. López-Trascasa, M.; Bing, D. H.; Rivard, M. and Nicholson-Weller, A. (1989) Factor J: isolation and characterization of a new polypeptide inhibitor of complement C1. *J. Biol. Chem.* **264**, 16214-16221.
22. Fu, S. M.; Kunkel, H. G.; Brusman, H. P.; Allen, F. H. Jr. and Fotino, M. (1974) Evidence for linkage between HLA histocompatibility genes and those involved in the synthesis of the second component of complement. *J. exp. Med.* **140**, 1108-1110.
23. Matsumoto, M.; Nagaki, K.; Kitamura, H.; Kuramitsu, S.; Nagasawa, S. and Seya, T.(1989) Probing the C4-binding site on C1s with monoclonal antibodies: evidence for a C4/C4b-binding site on the gamma-domain. *J. Immunol.* **142**, 2743-2750.
24. Budzko, D. B. and Müller-Eberhard, H. J.(1970) Cleavage of the fourth component of human complement (C4) by C1 esterase: isolation and characterization of the low molecular weight product. *Immunochemistry* **7**, 227-234.
25. Isenman, D. E. & Kells, D. I. C.(1982) Conformational and functional changes in the fourth component of human complement produced by nucleophilic modification and by proteolysis with C1s. *Biochemistry* **21**, 1109-1117.
26. Kirschfink, M. & Borsos, T.(1988) Binding and activation of C4 and C3 on the red cell surface by non-complement enzymes. *Mol. Immunol.* **25**, 505-512.
27. Kerr, M. A.(1980) The human complement system: assembly of the classical pathway C3 convertase. *Biochem. J.* **189**, 173-181.
28. Malmheden, Y. I.; Lundwall, A.; Stalenheim, G. and Sjöquist, J.(1981) The effect of trypsin cleavage on the structure and function of human C4. *FEBS Letters* **132**, 187-192.
29. Lundwall, A.; Malmheden, Y. I.; Hellman, U. and Sjöquist, J.(1981) Interaction between the labile binding site of human C4 and methylamine. *Scand. J. Immunol.* **13**, 199-203.
30. Thielens, N.; Villiers, C. L.; Villiers, M. B. and Colomb, M. G.(1984) Comparative study of the fluid-phase proteolytic cleavage of human complement subcomponents C4 and C2 by C1s and C1r2-C1s2. *FEBS Letters* **165**, 111-116.

31. Vogt, W.; Hinsch, B.; Schmidt, G. and von Zabern, I.(1982) Function of the activated fourth component of complement (C4b) in activation of C2. *FEBS Letters* **144**, 195-198.
32. Oglesby, T. J.; Accavitti, M. A. and Volanakis, J. E.(1988) Evidence for a C4b binding site on the C2b domain of C2. *J. Immunol.* **141**, 926-931.
33. Nagasawa, S. & Stroud, R. M.(1977) Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: Demonstration of binding of C2b to C4b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2998-3001.
34. Müller-Eberhard, H. J.; Polley, M. J. and Calcott, M. A.(1966) Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement. *J. exp. Med.* **125**, 359-380.
35. Smith, C. A.; Vogel, C-W. and Müller-Eberhard, H. J.(1984) MHC class III products: an electro microscopic study of the C3 convertases of human complement. *J. exp. Med.* **159**, 324-329.
36. Takata, Y.; Kinoshita, T.; Kozono, H.; Takeda, J.; Tanaka, S.; Hong, K. and Inoue, K.(1987) Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical pathway. *J. exp. Med.* **165**, 1494-1507.
37. Kim, Y.; Carroll, M. C.; Isenman, D. E.; Nonaka, M.; Pramoonjago, P.; Takeda, J.; Inoue, K. and Kinoshita, T.(1992) Covalent binding of C3b to C4b within the classical complement pathway C5 convertase. Determination of amino acids residues involved in ester linkage formation. *J. Biol. Chem.* **267**, 4171-4176
38. Kitamura, H.; Tsuboi M. and Nagaki, K.(1986) The activation of C5 in the fluid phase and in absence of C3 through the classical pathway of the complement system. *Immunology* **58**, 459-465.
39. Masaki, T.; Matsumoto, M.; Yasuda, R.; Levine, R. P.; Kitamura, H. and Seya, T.(1991) A covalent dimer of complement C4b serves as a subunit of a novel C5 convertase that involves no C3 derivatives. *J. Immunol.* **147**, 927-932.
40. Goldberger, G.; Arnaout, M. A.; Williams, J. and Colten, H. R.(1984) Biosynthesis and postsynthetic processing of human C3b/C4b inactivator (factor I) in three hepatoma cell lines. *J. Biol. Chem.* **259**, 6492-6497.
41. Dahlback, B.; Smith, C. A. and Müller-Eberhard, H. J.(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3461.
42. Fujita, T. & Tamura, N.(1983) Interaction of C4-binding protein with cell-bound C4b. A quantitative analysis of binding and the role of C4-binding protein in proteolysis of cell-bound C4b. *J. exp. Med.* **157**, 1239-1251.
43. Rodríguez de Córdoba, S.; Lublin, D. M.; Rubinstein, P. and Atkinson, J. P.(1985) Human genes for three complement component that regulate the activation of C3 are tightly linked *J. exp. Med.* **161**, 3461.
44. Klickstein, L. B.; Wong, W. W.; Smith, J. A.; Weis, J. H.; Wilson, J. G. and Fearon, D. t.(1987) Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. *J. exp. Med.* **165**, 1095-1112.

45. Nicholson-Weller, A.; Burge, J.; Fearon, D. t.; Weller, P. F. and Austen, K. F.(1982) Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J. Immunol.* **129**, 184-189.
46. Thielens, N. & Colomb, M. G.(1986) A model system for the study of the assembly and regulation of human complement C3 convertase (classical pathway). *Eur. J. Immunol.* **16**, 617-622.
47. Gigli, I.; Fujita, T. and Nussenzweig, V.(1979) Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3 inactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **12**, 6596-6600.
48. Nagasawa, S.; Kobayashi, C.; Maki-Suzuki, T.; Yamashita, N. and Koyama, J.(1985) Purification and characterization of the C3 convertase of the classical pathway of human complement system by size exclusion. *J. Biochem. Tokio.* **97**, 493-499
49. Nagasawa, S.; Kobayashi, C.; Maki-Suzuki, T.; Yamashita, N. and Koyama, J.(1985) Purification and characterization of the C3 convertase of the classical pathway of human complement system by size exclusion high-performance liquid chromatography. *J. Biochem.* **97**, 493-499.
50. Shiraishi, S. & Stroud, R. M.(1975) Cleavage products of C4b produced by enzymes in human serum. *Immunochemistry* **12**, 935-939.
51. Medof, M. E. & Nussenzweig, V.(1984) Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by complement receptor CR1. *J. exp. Med.* **159**, 1669-1685.
52. Klickstein, L. B.; Bartow, T. J.; Miletic, V.; Rabson, L. D.; Smith, J. A. and Fearon, D. T.(1986) Identification of distinct C3b and C4b recognition sites in the human C3b/C4b receptor (CR1,CD35) by deletion mutagenesis. *J. exp. Med.* **168**, 1699-1717.
53. von Zabern, I.; Bloom, E. L.; Chu, V. and Gigli, I.(1982) The fourth component of human complement treated with amines or chaotropes or frozen-thawed (C4b-like C4): interaction with C4 binding protein and cleavage by C3b/C4b inactivator. *J. Immunol.* **128**, 1433-1438.
54. Gigli, I.; Sorvillo, J.; Mecarelli-Halbwachs, L. and Leibowitch, J.(1981) Mechanism of action of the C4 nephritic factor. *J. exp. Med.* **154**, 1-12.
55. Gigli, I.; Sorvillo, J. and Halbwachs-Mecarelli, L.(1985) Regulation and desregulation of the fluid-phase classical pathway. *J. Immunol.* **135**, 440-444.
56. Fischer, E.; Kazatchkine, M. D. and Mecarelli-Halbwachs, L.(1984) Protection of the classical and alternative complement pathway C3 convertases, stabilized by nephritic factors, from decay by the human C3b receptor. *Eur. J. Immunol.* **14**, 1111-1114.
57. Villiers, M. B.; Thielens, N. and Colomb, M. G.(1985) Soluble C3 proconvertase and convertase of the classical pathway of human complement. *Biochem. J.* **226**, 429-436.
58. Pangburn, M. K.; Schreiber, R. D. and Müller-Eberhard, H.J.(1981) Formation of the initial C3-convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of

the putative thioester in native C3. *J. exp. Med.* **154**, 856-867.

59. Brown, E.; Berger, R.; Joiner, K. A. and Frank, M. M.(1983) Classical complement pathway activation by antipneumococcal antibodies leads to covalent binding of C3b to antibody molecules. *Infection and Immunity* **42**, 594-598.
60. Hong, K.; Kinoshita, T.; Pramoonjago, P.; Uck Kim, Y.; Seya, T. and Inoue, K.(1991) Reconstitution of C5 convertase of the alternative complement pathway with isolated C3b dimer and factors B and D. *J. Immunol.* **146**, 1868-1873.
61. Barrio, E.; Antón, L. C.; Marqués, G.; Sánchez, A. and Vivanco F.(1991). Formation of covalently linked C3-C3 dimers on IgG immune aggregates. *Eur. J. Immunol.* **21**, 343-349.
62. Shinkai, Y.; Takio, K. and Okumura, K.(1988) Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature* **334**, 525-527.
63. Podack, E. R.(1983) Lisis celular mediada por complemento. *Inmunología.* **2**, 81-91.
64. Kinoshita, T.(1991) Biology of complement: the overture. *Immunology today* **12**, 291-295.
65. Rother, K.(1972) Leukocyte mobilizing factor derived from the third component of complement. *Eur. J. Immunol.* **2**, 550-557.
66. Ghebrehiwet, B. & Müller-Eberhard, H. J.(1978) C3e: un acidic fragment of human C3 with leukocytosis-inducing activity. *J. Immunol.* **123**, 616-621.
67. Meuth, J. L.; Morgan, E. L.; Discipio, R. G. and Hugli, T. E.(1983) Suppression of T lymphocyte functions by human C3 fragments. I. Inhibition of human T cell proliferative responses by kallikrein cleavage fragment of human iC3b. *J. Immunol.* **130**, 2605-2611.
68. Hugli, T. E. (1983) The chemistry and biology of C3a, C4a and C5a and their effects on cells. *Biological response mediators and modulators* (Academic Press), ed) Academic Press,
69. Schifferli, J. A.; Bartolotti, S. R. and Peters, D. K.(1980) Inhibition of immune precipitation by complement. *Clin. exp. Immunol.* **42**, 387-394.
70. Czop, J. & Nussenzweig, V.(1976) Studies on the mechanism of solubilization of immune precipitates by serum. *J. exp. Med.* **143**, 615-630.
71. Johnson, A.; Harkin, S.; Steward, M. W. and Whaley, K.(1987) The effects of immunoglobulin isotype and antibody affinity on complement-mediated inhibition of immune precipitation and solubilization. *Mol. Immunol.* **24**, 1211-1217.
72. Schifferli, J. A.; Steiger, G. and Schapira, M.(1985) The role of C1, C1 inactivator and C4 in modulating immune precipitation. *Clin. exp. Immunol.* **60**, 605-612.
73. Schifferli, J. A.; Woo, P. and Peters, D. K.(1982) Complement-mediated inhibition of immune

- precipitation. I. Role of the classical and alternative pathways. *Clin. exp. Immunol.* **47**, 555-562.
74. Naama, J. K.; Hamilton, A. O.; Yeung-Laiwah, A. C. and Whaley, K.(1984) Prevention of immune precipitation by purified classical pathway complement components. *Clin. exp. Immunol.* **58**, 486-492.
75. Schifferli, J. A. & Peters, D. K.(1982) Complement-mediated inhibition of immune precipitation. II. Analysis by sucrose density gradient ultracentrifugation. *Clin. exp. Immunol.* **47**, 563-569.
76. Whaley, K.(1987) complement and immune complex disease en Complement in Health and Disease pp 163-184.(MTP Press), ed) Whaley, K., Lancaster.
77. Fujita, T.; Takata, Y. and Tamura, N.(1981) Solubilization of immune precipitates by six isolated alternative pathway proteins. *J. exp. Med.* **154**, 1743-1751.
78. Johnston, A.; Auda, G. R.; Kerr, M. A.; Steward, M. W. and Whaley, K.(1992) Dissociation of primary antigen-antibody bonds is essential for complement mediated solubilization of immune precipitates. *Mol. Immunol.* **29**, 659-665.
79. Miller, G. W. & Nussenzweig, V.(1975) A new complement function: solubilization of antigen-antibody aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 418-422.
80. Stewart, W. W.; Johnson, A.; Steward, M. W.; Whaley, K. and Kerr, M. A.(1988) The activation of C3 and C4 in human serum by immune complexes containing mouse monoclonal antibodies of different isotype and affinity: effects on solubilisation. *Mol. Immunol.* **25**, 1355-1361.
81. Stassen, F. L. & Beek, C. J.(1982) Antibody avidity and complement-mediated solubilization of precipitates during the immune response. *Immunology* **45**, 289-295.
82. Takahashi, M.; Tack, B. F. and Nussenzweig, V.(1977) Requiriments for the solubilization of immune aggregates by complement. *J. exp. Med.* **145**, 86-100.
83. Takahashi, M.; Takahashi, S. and Hirose, S.(1980) Solubilization of antigen-antibody complexes: a new function of complement as a regulator of immune reactions. *Prog. Allergy* **27**, 134-166
84. Takahashi, M.; Takahashi, S.; Brade, V. and Nussenzweig, V.(1978) Requiriments for the solubilization of immune aggregates by complement. The role of the classical pathway. *J. Clin. Invest.* **62**, 349-358
85. Varga, L.; Thiry, E. and Füst, G.(1988) BSA_antiBSA immune complexes formed in the presence of human complement do not bind to autologous red blood cells. *Immunology* **64**, 381-384.
86. Emlen, W.; Burdick, G.; Carl, V. and Lachmann, P. J.(1989) Binding of model immune complexes to erythrocyte CR1 facilitates immune complex uptake by U937 cells. *J. Immunol.* **142**, 4366-4371.
87. Erdel, A.; Spaeth, E.; Alsenz, J.; Rüde, E.; Schulz, T.; Gergely, J. and Dierich, M. P.(1984) Role of C3b receptors in the enhancement of interleukin-2-dependent T-cell proliferation. *Mol. Immunol.* **21**, 1215-1221.

88. Morgan, E. L.; Weigle, W. O. and Hugli, T. E.(1982) Anaphylatoxin-mediated regulation of the immune response. I. C3a mediated suppression of human and murine humoral immune response. *J. exp. Med.* **155**, 1412-1426.
89. Klaus, G. G. B.(1982) Immune complexes and the problem of immunological memory. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* **133C**, 221-227.
90. Weitkamp, L. R. & Lamm, L. U.(1982) Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. *Cytogenetic Cell Genet.* **32**, 130-143.
91. Ochs, H. D. et al., (1977) Linkage between the gene (or genes) controlling synthesis of the fourth component of complement and the major histocompatibility complex. *N. Eng. J. Med.* **296**, 470-475.
92. Teisberg, P.; Akessen, I.; Olaisen, B.; Gedde-Dahl Jr., T. and Thorsby, E.(1976) Genetic polymorphism of C4 in man and localisation of a structural C4 locus to the HLA gene complex of chromosome 6. *Nature* **264**, 253-254.
93. Whitehead, A. S.; Colten, H. R.; Chang, C. C. and Demars, R.(1985) Localization of the human MHC-linked complement genes between HLA-B and HLA-DR by using HLA mutant cell lines. *J. Immunol.* **134**, 641-643.
94. Bruun-Petersen, G.; Lamm, L. U.; Sorensen, I. J.; Buskjaer, L. and Mortensen, J. P.(1981) Family studies of complement C4 and HLA in man. *Hum. Genet.* **58**, 260-267.
95. Olaisen, B.; Teisberg, P.; Jonassen, R. and Gedde-Dahl Jr., T(1979) The C4 system: formal and population genetics. *Hum. Genet.* **50**, 187-192.
96. Olaisen, B.; Teisberg, P.; Nordhagen, R.; Michaelsen, T. and Gedde-Dahl Jr., T(1979) Human complement C4 locus is duplicated on some chromosomes. *Nature* **279**, 736-737.
97. Awdeh, Z. L.; Raum, D. and Alper, C. A.(1979) Genetic polymorphism of human complement complement C4 and detection of heterozygotes. *Nature* **282**, 205-206.
98. O'Neill G.J., ; Yang, S. Y. and Dupont, B.(1978) Two HLA-linked loci controlling the fourth component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 5165-5169.
99. Carroll, M. C.; Campbell, R. D.; Bentley, D. R. and Porter, R. R.(1984) A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* **307**, 237-241.
100. Carroll, M. C.; Campbell, R. D. and Porter, R. R.(1985) Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 521-525.
101. White, P. C.; Grossberger, D.; Onufer, B. J.; Chaplin, D. D.; New, M. I.; Dupont, B. and Strominger, J. L.(1985) Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1089-1093.

102. White, P. C.; New, M. I. and Dupont, B.(1986) Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5111-5115.
103. Carroll, M. C. & Porter, R. R.(1983) Cloning of a human complement component C4 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 264-267.
104. Yu, C. Y.(1991) The complete exon-intron structure of a human complement component C4A gene. DNA sequences, polymorphism, and linkage to the 21-hydroxylase gene. *J. Immunol.* **146**, 1057-1066.
105. Schneider, P. M.; Carroll, M. C.; Alper, C. A.; Rittner, Ch.; Whitehead, A. S.; Yunis, E. J. and Colten, H. R.(1986) Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes. Restriction fragment length polymorphisms revealing structural deletions, homoduplications and size variants. *J. Clin. Invest.* **78**, 650-657.
106. Palsdottir, A.; Fossdal, R.; Arnason, A.; Edwards, J. H. and Jensson, O.(1987) Heterogeneity of human C4 gene size. A large intron (6.5 Kb) is present in all C4A genes and some C4B genes. *Immunogenetics* **25**, 299-304.
107. Garlepp, M. J.; Wilton, A. N.; Dawkins, R. L. and White, P. C.(1986) Rearrangement of 21-hydroxylase genes in disease-associated MHC supratypes. *Immunogenetics* **23**, 100-105.
108. Dunham, I.; Sargent, C. A.; Dawkins, R. L. and Campbell, R. D.(1989) Direct observation of the gene organization of the complement C4 and 21-hydroxylase loci by pulsed field gel electrophoresis. *J. exp. Med.* **169**, 1803-1816.
109. Morel, Y.; Bristow, J.; Gitelman, S. E. and Miller, W. L.(1989) Transcript encoded on the opposite strand of the human steroid 21-hydroxylase/complement component C4 gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6582-6586.
110. Lévi-Strauss, M.; Carroll, M. C.; Steinmetz, M. and Mei, T.(1988) A previously undetected MHC gene with an unusual periodic structure. *Science (Wash D. C.)* **240**, 201.
111. Matsumoto, M.; Ishihara, N.; Ando, A.; Inoko, H. and Ikemura, T.(1992) Extracellular matrix protein tenascin-like gene found in human MHC Class III region. *Immunogenetics* **36**, 400-403.
112. Schreiber, R. D. & Müller-Eberhard, H. J.(1974) Fourth component of human complement: Description of a three polypeptide chain structure. *J. exp. Med.* **140**, 1324-1335.
113. Gigli, I.; von Zabern, I. and Porter, R. R.(1977) The isolation and structure of C4, the fourth component of human complement. *Biochem. J.* **165**, 439-446.
114. Ostenberg, R.; Eggersten, G.; Lundwall, A. and Sjöquist, J.(1984) Conformational change of complement proteins C3 and C4 induced by methylamine: an X-ray scattering study. *Int. J. Biol. Macromol.* **6**, 195-198.
115. Chan, A. C. & Atkinson, J. P.(1985) Oligosaccharide structure of human C4. *J. Immunol.* **134**, 1790-1798.

116. Hortin, G.; Sims, H. and Strauss, A. W.(1986) Identification of the site of sulfation of the fourth component of human complement. *J. Biol. Chem.* **261**, 1786-1793.
117. Hortin, G.; Farries, T. C.; Graham, J. P. and Atkinson, J. P.(1989) Sulfation of tyrosine residues increases activity of the fourth component of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1338-1342.
118. Belt, K. T.; Carroll, M. C. and Porter, R. R.(1984) The structural basis of the multiple forms of human complement component C4. *Cell* **36**, 907-914.
119. Seya, T.; Nagasawa, S. and Atkinson, J. P.(1986) Location of the interchain disulfide bonds of the fourth component of human component (C4): Evidence based on the liberation of fragments secondary to thiol-disulfide interchange reactions. *J. Immunol.* **136**, 4152-4156.
120. Janatova, J.(1986) Detection of disulphide bonds and localization of interchain linkages in the third (C3) and the fourth (C4) components of human complement. *Biochem. J.* **233**, 819-825.
121. Reboul, A.; Thielens, N.; Villiers, M. B. and Colomb, M. G.(1979) Purification of human complement subcomponent C4 (C4 cleavage by C1s). *FEBS Letters* **103**, 156-161.
122. Hessing, M.; Van't Heer, C. and Bouma, B. N.(1990) The binding site of human C4b-binding protein on complement C4 is localized in the α' chain. *J. Immunol.* **144**, 2632-2637.
123. Hessing, M.; Vlooswijk, R. A. A.; Hackeng, T. M.; Kantes, D. and Bouma, B. N.(1990) The localization of heparin-binding fragments on human C4b-binding protein. *J. Immunol.* **144**, 204.
124. Kozono, H.; Kinoshita, T.; Kim, Y. U.; Takata-Kozono, Y.; Tsunasawa, S.; Sakiyama, F.; Takeda, J.; Hong, K. and Inoue, K.(1990) Localization of the covalent C3b-binding site on C4b within the complement classical pathway C5 convertase, C4b2a3b. *J. Biol. Chem.* **265**, 14444-14449.
125. Ichihara, C.; Nakamura, T.; Nagasawa, S. and Koyama, J.(1986) Monoclonal anti-human C4b antibodies: stabilization and inhibition of the classical-pathway C3 convertase. *Mol. Immunol.* **25**, 151-157.
126. Ebanks, R. O.; Jairakan, A. S.; Carroll, M. C.; Anderson, M. J.; Campbell, R. D. and Isenman, D. E.(1992) A single to tryptophan interchange at beta-chain residue 458 of human complement component C4 accounts for the defect in classical pathway C5 convertase activity of allotype C4A6. Implications for the location of a C5 binding site in C4. *J. Immunol.* **148**, 2803-2811.
127. Ejzemberg, R.; Brown, E.; Ohanian, S. H.; Hammer, C. H. and Borsos, T.(1983) Cell-bound C4b resist reduction by reducing agents: analysis by chain structure and by hemolytic activity. *J. Immunol.* **130**, 2825-2829.
128. Yamazaki, M.; Ichihara, C. and Nagasawa S.(1986) Evidence that a nicked C4b, C4b', is a functionally active C4b derivative. *FEBS Letters* **208**, 147-150.
129. Press, E. M. & Gagnon, J.(1981) Human complement component C4: Structural studies on the fragments derived from C4b by cleavage with C3b inactivator. *Biochem. J.* **199**, 351-357.
130. Hall, R. E. & Colten, H. R.(1977) Cell-free synthesis of the fourth component of guinea pig complement

- (C4): Identification of a precursor of serum C4 (pro-C4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1707-1710.
131. Fey, G.; Odink, K. and Chapuis, R. M.(1980) Synthesis of the mouse complement component C4 (Ss-protein) by peritoneal macrophages: Kinetics of secretion and glycosilation of the subunits. *Eur. J. Immunol.* **10**, 75-82.
132. Strunk, R. C.; Eidlen, D. M. and Mason, R. J.(1988) Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement. *J. Clin. Invest.* **81**, 1419-1426.
133. Witte, D. P.; Welch, T. R. and Beischel, L. S.(1991) Detection and cellular localization of human C4 gene expression in the renal tubular epithelial cells and other extrahepatic epithelial sources. *Am. J. Path.* **139**, 717-724.
134. Tsukamoto, H.; Nagasawa, S.; Yoshizawa, S.; Tada, Y.; Ueda, A.; Ueda, Y. and Niho, Y.(1992) Synthesis and regulation of the fourth component of complement (C4) in the human monocytic cell line U937: comparaisn with that if the third component of complement (C3). *Immunology* **75**, 565-569.
135. Gigli, I.(1978) A single chain precursor of C4 in human serum. *Nature* **272**, 836-837.
136. Karp, D. R.(1983) Post-translational modification of the fourth component of complement. *J. Biol. Chem.* **258**, 12745-12748.
137. Karp, D. R.(1983) Post-traslational modification of the fourth component of complement: Effect of tunicamycin and amino acid analogs on the formation of the internal thiolester and disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **258**, 14490-14495.
138. Parker, K. L.; Shreffler, D. C. and Capra, J. D.(1980) Partial amino-acid sequences of the murine fourth component of complement (C4): Demonstration of homology with human C4 and identification of the amino-terminal subunit in pro-C4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4275-4278.
139. Golberger, G.; Abraham, G. N.; Williams, J. and Colten, H. R.(1980) NH₂-terminal sequence analysis of pro-C4, the precursor of the fourth component of guinea pig complement. *J. Biol. Chem.* **255**, 7071-7074.
140. Golberger, G. & Colten, H. R.(1980) Precursor complement protein (pro-C4) is converted "in vitro" to native C4 by plasmin. *Nature* **286**, 514-516.
141. Chan, A. C. & Atkinson, J. P.(1983) Identification and structural characterization of two incompletely processed forms of the fourth component of human complement. *J. Clin. Invest.* **72**, 1639-1649.
142. Chan, A. C. & Atkinson, J. P.(1984) Functional studies on the secreted form of human C4 (C4s), two incompletely processed two-subunit C4 molecules (β - α + τ and β + α - τ), and pro-C4. *J. Immunol.* **132**, 1967-1971.
143. Chan, A. C.; Mitchell, K. R.; Munns, T. W.; Karp, D. R. and Atkinson, J. P.(1983) Identification and partial characterization of the secreted form of the fourth component of human complement: Evidence that it is different from major plasma form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 268-272.

144. Karp, D. R.; Shreffler, D. C. and Atkinson, J. P.(1982) Characterization of the Mr difference between secreted murine fourth component of complement and the major form: Evidence for carboxyl-terminal cleavage of the α chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6666-6670.
145. Hortin, G.; Chan, A. C.; Fok, K. F.; Strauss, A. W. and Atkinson, J. P.(1986) Sequence analysis of the COOH terminus of the α chain of the fourth component of human complement: Identification of the site of its extracellular cleavage. *J. Biol. Chem.* **261**, 9065-9069.
146. Wolf, U.; Bauer, D. and Traub, W. H.(1991) Metalloproteases of *Serratia liquefaciens*: degradation of purified human serum proteins. *Int. J. Med. Microbiol.* **276**, 16-26.
147. Auerbach, H. S.; Baker, R. D.; Matthews Jr., W. J. and Colten, H. R.(1984) Molecular mechanism for feedback regulation of C4 biosynthesis in guinea pig peritoneal macrophage. *J. exp. Med.* **159**, 1750-1761.
148. Goldmann, J. N.; O'Rourke, K. S.; McMannis, J. D. and Goldmann, M. B.(1988) Effects of anti-C4 antibody on complement production by splenic and peritoneal macrophages. *Complement* **5**, 13-26.
149. Goldmann, M. B.; Becker, D. S.; O'Rourke, K. S. and Goldmann, J. N.(1985) Enhancement by cyclic AMP of antibody-induced suppression of the fourth component of complement. *J. Immunol.* **135**, 2701-2706.
150. Matthews, W. J.; Golberger, G.; Marino, J. T.; Einstein, L. P.; Gash, D. J. and Colten, H. R.(1982) Complement protein C2, C4 and factor B: effect of glycosylation on their secretion and catabolism. *Biochem. J.* **204**, 839-846.
151. Goldmann, J. N.; O'Rourke, K. S. and Goldmann, M. B.(1985) Antibody-induced suppression and postsuppression stimulation of complement in vitro. Long-term C4 suppression is actively maintained by a soluble suppressor factor (FsC4). *Cell. Immunol* **96**, 26-37.
152. Campbell, R. D.; Gagnon, J. and Porter, R. R.(1981) Amino acid sequence around the thiol and reactive acyl groups of human complement component C4. *Biochem. J.* **199**, 359-370.
153. Howard, J. B.(1981) Reactive site in human alpha-2-macroglobulin: circumstantial evidence for a thiolester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2235-2239.
154. Thomas, M. L.; Janatova, J.; Gray, W. R. and Tack, B. F.(1982) Third component of human complement: localization of the internal thiolester bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1054-1057.
155. Gorski, J. P. & Howard, J. B.(1980) Effect of methylamine on the structure and function of the fourth component of human complement. *J. Biol. Chem.* **255**, 10025-10028.
156. Lafayette, H. N.; Kuby, S. A. and Lardy, H. H.(1952) Properties of thiolesters. Kinetics of hydrolysis in dilute aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 913-917.
157. Isenman, D. E.; Kells, D. I. C.; Cooper, N. R.; Müller-Eberhard, H. J. and Pangburn, M. K.(1981) Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional. *Biochemistry* **20**, 4458-4467.

158. Sánchez-Corral, P.; Antón, L. C.; Alcolea, J. M.; Marqués, G.; Sánchez, A. and Vivanco, F.(1989) Separation of active and inactive forms of the third component of human complement, C3, by fast protein liquid chromatography (FPLC). *J. Immunol. Methods* **122**, 105-113.
159. Khan, S. A. & Erickson, B. W.(1982) An equilibrium model of the metastable binding sites of $\alpha 2$ macroglobulin and complement proteins C3 and C4. *J. Biol. Chem.* **257**, 11864-11867.
160. Folk, J. E. & Chung, S. I.(1973) . *Adv. Enzimol. Relat. Areas Mol. Biol.* **38**, 109-191
161. Pangburn, M. K.(1992) Spontaneous thioester bond formation in alpha 2-macroglobulin, C3 and C4. *FEBS Letters* **308**, 280-282.
162. Pangburn, M. K.(1992) Spontaneous reformation of the intramolecular thioester in complement protein C3 and low temperature capture of a conformational intermediate capable of reformation. *J. Biol. Chem.* **267**, 8584-8590.
163. Isaac, L. & Isenman, D. E.(1923) Structural requeriments for thioester bond formation in human complement component C3. Reassassment of the role of thioester bond integrity on the conformation of C3. *J. Biol. Chem.* **267**, 10062-10069.
164. Iijima, M.; Tobe, T.; Sakamoto, T. and Tomita, M.(1984) Biosynthesis of the internal thioester bond of the third component of complement. *J. Biochem.* **96**, 1539-1546.
165. Sim, R. B. & Sim, E.(1981) Autolytic fragmentation of complement components C3 and C4 under denaturing conditions, a property shared with alpha-2-macroglobulin. *Biochem. J.* **193**, 129-141.
166. Janatova, J. & Tack, B. F.(1981) Fourth component of human complement: studies of an amine-sensitive site comprend of a thiol component. *Biochemistry* **20**, 2394-2402.
167. Davies, S. G. & Sim, R. B.(1981) Intramolecular general catalysis in the binding reactions of alpha-2-macroglobulin and complement compoenents C3 and C4. *Bioscience reports* **1**, 461-468.
168. O'Neill G.J., ; Yang, S. Y.; Tegoli, J.; Berger, R. and Dupont, B.(1978) Chido and Rodgers blood groups are distintict antigenic components of human complement C4. *Nature* **273**, 668-670
169. Tilley, C. A.; Romans, D. G. and Crookston, M. C.(1978) Localisation of Chido and Rodgers determinants to the C4d fragment of human C4. *Nature* **276**, 713-716.
170. Giles, C. M. & Ford, D. S.(1986) A monoclonal anti-C4d that demonstrates a specificity related to anti-Ch. *Transfusion* **26**, 370-374.
171. Lundwall, A.; Hellman, U.; Eggersten, G. and Sjöquist, J.(1982) Isolation of tryptic fragments of human C4 expressing Chido and Rodgers antigens. *Mol. Immunol.* **19**, 1655-1665.
172. Hellman, U.; Eggersten, G.; Lundwall, A.; Engstrom, A. and Sjöquist, J.(1992) Primary sequence differences between Chido and Rodgers variants of tryptic C4d of the human complement system. *FEBS Letters* **170**, 254-257.

173. Chu, V. F. H.; Marsh, W. L. and Gigli, I.(1982) Chido and Rodgers antigenic determinant on the fourth component of human complement. *J. Immunol.* **128**, 181-185.
174. Dodds, A. W.; Law, S. K. and Porter, R. R.(1986) The purification and properties of some less common allotypes of the fourth component of human complement. *Immunogenetics* **24**, 279-285.
175. Roos, M. H.; Giles, C. M.; Demant, P.; Mollenhauer, E. and Rittner, Ch.(1984) Rodgers (Rg) and Chido (Ch) determinants on human C4: characterization of two C4B5 subtypes, one of which contains Rg and Ch determinants. *J. Immunol.* **133**, 2634-2640.
176. Hing, S. N.; Giles, C. M.; Fielder, A. H. L. and Batchelor, J. R.(1986) HLA haplotypes with C4B5; evidence for further allelic heterogeneity. *Immunogenetics* **23**, 151-155.
177. Rittner, Ch.; Tippet, P.; Giles, C. M.; Mollenhauer, E.; Berger, R.; Nordhagen, R.; Buskjoer, L.; Bruun-Petersen, G.; Laam, L. and Roos, M. H.(1984) An international reference typing for Ch and Rg determinants on rare human C4 allotypes. *Vox Sang* **46**, 224-234.
178. Giles, C. M.(1984) A new genetic variant for Chido. *Vox Sang* **46**, 149-156.
179. Giles, C. M.(1985) 'Partial inhibition' of anti-Rg and anti-Ch reagents. II. Demonstration of separable antibodies for different determinants. *Vox Sang* **48**, 167-173.
180. Giles, C. M.(1987) Three Chido determinants detected on the B5Rg+ of human C4. Their expression in Ch-typed donors and families. *Human Immunol.* **8**, 111-122.
181. Yu, C. Y. & Campbell, R. D.(1987) Definitive RFLPs to distinguish between the human complement C4A/C4B isotypes and the major Rodgers/Chido determinants: application to the study of C4 null alleles. *Immunogenetics* **25**, 383-390.
182. Yu, C. Y.; Belt, K. T.; Giles, C. M.; Campbell, R. D. and Porter, R. R.(1986) Structural basis of the polymorphism of human complement components C4A and C4B: gene size, reactivity and antigenicity. *EMBO J.* **5**, 2873-2881.
183. Yu, C. Y.; Campbell, R. D. and Porter, R. R.(1988) A structural model for the location of the Rodgers and Chido antigenic determinants and their correlation with the human complement component C4A/C4B isotypes. *Immunogenetics* **27**, 399-405.
184. Ziccardi, R. J.(1983) The first component of human complement (C1): activation and control. *Springer Semin. Immunopath.* **6**, 213-230.
185. Atkinson, J. P.; Chan, A. C.; Karp, D. R.; Killion, C. C.; Brown, R.; Spinella, D.; Shreffler, D. C. and Levine, R. P.(1988) Origin of the fourth component of complement related Chido and Rodgers blood group antigens. *Complement* **5**, 65-76.
186. Giles, C. M.; Davies, K. A. and Walport, M. J.(1991) In vivo and in vitro binding of C4 molecules on red cells: a correlation of numbers of molecules and agglutination. *Transfusion* **31**, 222-228

187. Gorski, J. P.; Hugli, T. E. and Müller-Eberhard, H. J.(1981) Characterization of human C4a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* **256**, 2707-2711.
188. Moon, K. E.; Gorski, J. P. and Hugli, T. E.(1981) Complete primary structure of human C4a anaphylatoxin. *J. Biol. Chem.* **256**, 8685-8692.
189. Gorski, J. P.; Hugli, T. E. and Müller-Eberhard, H. J.(1979) C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5299-5302.
190. Hugli, T. E.; Kawahara, M. S.; Unson, C. G.; Molinar-Rode, R. and Erickson, B. W.(1983) The active site of human C4a anaphylotoxin. *Mol. Immunol.* **20**, 637-645.
191. Reboul, A.; Thielens, N.; Villiers, M. B. and Colomb, M. G.(1980) Structural changes in C4 produced by cleavage with C1s. *FEBS Letters* **115**, 118-122.
192. Belt, K. T.; Yu, C. Y.; Carroll, M. C. and Porter, R. R.(1985) Polymorphism of human complement component C4. *Immunogenetics* **21**, 173-180.
193. Sim, E.; Dodds, A. W. and Goldin, A.(1989) Inhibition of the covalent binding reaction of complement component C4 by penicillamine, an anti-rheumatic agent. *Biochem. J.* **259**, 415-419.
194. Roos, M. H.; Mollenhauer, E.; Demant, P. and Rittner, Ch.(1982) A molecular basis for the two locus model of human complement component C4. *Nature* **298**, 854-856.
195. Kishore, N.; Shah, D. D.; Skanes, V. M. and Levine, R. P.(1988) The fluid-phase binding of human C4 and its genetic variants, C4A3 and C4B1, to immunoglobulins. *Mol. Immunol.* **25**, 811-819.
196. Law, S. K.; Dodds, A. W. and Porter, R. R.(1984) A comparaison of the properties of two classes, C4A and C4B, of the human component complement C4. *EMBO J.* **3**, 1819-1823.
197. Isenman, D. E. & Young, J. R.(1986) Covalent binding properties of the C4A and C4B isotypes of the fourth component of human complement on several C1-bearing cell surfaces. *J. Immunol.* **136**, 2542-2550.
198. Gatenby, P. A.; Barbosa, J. E. and Lachmann, P. J.(1990) Differences between C4A and C4B in the handling of immune complexes: the enhancement of CR1 binding is more important than the inhibition of immunoprecipitation. *Clin. exp. Immunol.* **79**, 158-163.
199. Schifferli, J. A.; Steiger, G.; Paccaud, J. P. and Sjöholm, A. G.(1963) Difference in the biological properties of the two forms of the fourth component of the human complement (C4). *Clin. exp. Immunol.* **63**, 473-477.
200. Schifferli, J. A.; Hauptmann, G. and Paccaud, J. P.(1987) Complement mediated adherence of immune complexes to human erythrocytes: difference in the requeriments for C4A and C4B. *FEBS Letters* **213**, 415-418.
201. Paul, L.; Skanes, V. M.; Mayden, J. and Levine, R. P.(1988) C4-mediated inhibition precipitation and

- differences in inhibitory action of genetic variants, C4A3 and C4B1. *Complement* **5**, 110-119.
202. Dodds, A. W. & Law, S. K.(1988) Structural basis of the binding specificity of the thioester-containing proteins, C4, C3 and alpha-2-macroglobulin. *Complement* **5**, 89-97.
203. Law, S. K.; Minich, T. M. and Levine, R. P.(1984) Covalent binding efficiency of the third and fourth complement proteins in relation to pH, nucleophilicity and availability of hydroxyl groups. *Biochemistry* **23**, 3267-3272.
204. Isenman, D. E. & Young, J. R.(1984) The molecular basis for the difference in immune hemolysis activity of the Chido and Rodgers isotypes of human complement component C4. *J. Immunol.* **132**, 3019-3027.
205. Awdeh, Z. L. & Alper, C. A.(1980) Inherited structural polymorphism of the fourth component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3576-3580.
206. Kinoshita, T.; Dodds, A. W.; Law, S. K. and Inoue, K.(1989) The low C5 convertase activity of the C4A6 allotype of human complement component C4. *Biochem. J.* **261**, 743-748.
207. Finco, O.; Li, S.; Cuccia, M.; Rosen, F. S. and Carroll, M. C.(1992) Structural differences between the two human complement C4 isotypes affect the humoral immune response. *J. exp. Med.* **175**, 537-543.
208. Carroll, M. C.; Fathallah, D. M.; Bergamaschini, L.; Alicot, E. M. and Isenman, D. E.(1990) Substitution of a single amino acid (aspartic acid for histidine) converts the functional activity of human complement C4B to C4A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6868-6872.
209. Bach, S.; Ruddy, S.; MacLaren, J. A. and Austen, K. F.(1971) Electrophoretic polymorphism of the fourth component of human complement (C4). *Immunology* **21**, 869-878.
210. Rosenfeld, S. I.; Ruddy, S. and Austen, K. F.(1969) Structural polymorphism of the fourth component of human complement. *J. Clin. Invest.* **48**, 2283.
211. Petersen, G. B.; Sorensen, I. J.; Buskjaer, L. and Lamm, L. U.(1979) Genetic studies of complement C4 in man. *Hum. Genet.* **53**, 31-36.
212. Mauff, G et al.(1983) Statement on the nomenclature of human C4 allotypes. *Immunobiol.* **164**, 184-191.
213. Dodds, A. W.; Law, S. K. and Porter, R. R.(1985) The origin of the very variable haemolytic activities of the common human complement component C4 allotypes including C4-A6. *EMBO J.* **4**, 2239-2244.
214. Palsdottir, A.; Cross, S. J.; Edwards, J. H. and Carroll, M. C.(1983) Correlation between a DNA restriction fragment length polymorphism and C4A6 protein. *Nature* **306**, 615-616.
215. Anderson, M. J.; Milner, C. M.; Cotton, R. G. and Campbell, R. D.(1992) The coding sequence of the hemolytically inactive allotype of human complement component C4 reveals that a single arginine to tryptophan substitution at beta-chain residue 458 is the likely cause of the defect. *J. Immunol.* **148**, 2795-2802

-
216. Uring-Lambert, B.; Goetz, J.; Tongio, M. M.; Mayer, S. and Hauptmann, G.(1984) C4 haplotypes with duplications at the C4A and C4B loci: frequency and associations with Bf, C2 and HLA-A,B,C and DR alleles. *Tissue antigens* **24**, 70-72.
217. Bruun-Petersen, G.; Lamm, L. U.; Jacobsen, B. K. and Kristensen, T.(1982) Genetics of complement C4. Two homoduplication haplotypes C4S C4S and C4F C4F in a family. *Hum. Genet.* **61**, 36-38.
218. Uring-Lambert, B., Giles, C. M., Goetz, J., Tongio, M. M., Mayer, S., and Hauptmann, G. (1984) C4 haplotypes with duplicated C4A or C4B: frequency and associations with Bf, C2, and HLA-A, B, C, DR alleles with special reference to the duplication C4B1,2. *Histocompatibility Testing* (Springer-Verlag, , ed) pp. 604-608, Bonn/Heidelberg/N.Y.
219. Whitehead, A. S.; Woods, D. E.; Fleishchnick, E.; Chin, J. E.; Yunis, E. J.; Katz, A. J.; Gerald, P. S.; Alper, C. A. and Colten, H. R.(1984) DNA polymorphism of the C4 genes. A new marker for analysis of the major histocompatibility complex. *N. Eng. J. Med.* **310**, 88-91.
220. Mauff, G.; Steuer, M.; Weck, M. and Bender, K.(1983) The C4 beta-chain: evidence for a genetically determined polymorphism. *Hum. Genet.* **64**, 186-188.
221. Robson, T.; Heard, R. N. S. and Giles, C. M.(1989) An epitope on C4 beta light (L) chains detected by human anti-Rg; its relationship with beta chain polymorphism and MHC associations. *Immunogenetics* **30**, 344-349.
222. Awdeh, Z. L.; Raum, D.; Yunis, E. J. and Alper, C. A.(1983) Extended HLA/complement allele haplotypes: evidence for T/t-like complex in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 259-263.
223. Welch, T. R. & Beischert, L.(1985) C4 uremic variant: an acquired C4 allotype. *Immunogenetics* **22**, 553-562.
224. Braun, L.; Schneider, P. M.; Giles, C. M.; Bertrams, J. and Rittner, Ch.(1990) Null alleles of human complement C4. Evidence for pseudogenes at the C4A locus and for gene conversion at the C4B locus. *J. exp. Med.* **171**, 129-140.
225. Rittner, Ch.; Giles, C. M.; Roos, M. H.; Démant, P. and Mollenhauer, E.(1984) Genetics of C4 polymorphism: detection and segregation of rare and duplicated haplotypes. *Immunogenetics* **19**, 321-333.
226. Raum, D.; Awdeh, Z. L.; Anderson, J.; Strog, L.; Granados, J.; Teran, L.; Giblett, E.; Yunis, E. J. and Alper, C. A.(1984) Human C4 haplotypes with duplicated C4A and C4B. *Am. J. Hum. Genet.* **36**, 72-79.
227. Schendel, D. J.; Wank, R. and O'Neill, G. J.(1985) C4 phenotypic variation suggests an unusual class III gene organization. *Vox Sang* **48**, 110-115.
228. Partanen, J. & Campbell, R. D.(1989) Restriction fragments analysis of non-deleted complement C4 null genes suggest point mutations in C4A null alleles but gene conversions in C4B null alleles. *Immunogenetics* **30**, 520-523.

-
229. Porter, R. R.(1984) Complement polymorphism, the major histocompatibility complex and associated diseases - a speculation. *Mol. Biol. Med.* **1**, 161-168.
230. Parker, K. L.; Roos, M. H. and Shreffler, D. C.(1979) Structural characterization of the murine fourth component of complement and sex-limited protein and their precursors: evidence for two loci in the S region of the H-2 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5853-5857.
231. Carroll, M. C. & Capra, J. D.(1979) Studies on murine Ss protein: demonstration that S region encodes structural gene for fourth component of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4641-4645.
232. White, P. C.; Chaplin, D. D.; Weis, J. H.; Dupont, B.; New, M. I. and Seidman, J. G.(1984) Two steroid 21-hydroxylase genes are located in the murine S region. *Nature* **312**, 465-467.
233. Roos, M. H.; Atkinson, J. P. and Shreffler, D. C.(1978) Molecular characterization of the Ss and SIp (C4) proteins of the mouse H-2 complex: subunit composition chain size polymorphism, and an intracellular (pro-Ss) precursor. *J. Immunol.* **121**, 1106-1115.
234. Nonaka, M.; Nakayama, K.; Yeul, Y. D. and Takahashi, M.(1985) Complete nucleotide and derived amino acid sequences of the fourth component of mouse complement (C4). *J. Biol. Chem.* **260**, 10936-10943.
235. Sepich, D. S.; Noonan, D. J. and Ogata, R. T.(1985) Complete cDNA sequence of the fourth component of murine complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5895-5899.
236. Karp, D. R.; Capra, J. D.; Atkinson, J. P. and Shreffler, D. C.(1982) Structural and functional characterization of an incompletely processed form of murine C4 and SIp. *J. Immunol.* **128**, 2336-2341.
237. Nonaka, M.; Nakayama, K.; Yeul, Y. D. and Takahashi, M.(1986) Complete nucleotide and derived amino acid sequences of sex-limited protein (Slp), nonfunctional isotype of the fourth component of mouse complement (C4). *J. Immunol.* **136**, 2989-2993.
238. Ferreira, A.; Nussenzweig, V. and Gigli, I.(1978) Structural and functional differences between the H-2 controlled Ss and SIp proteins. *J. exp. Med.* **148**, 1186-1197.
239. Brown, L. & Shreffler, D. C.(1980) Female expression of H-2-linked a sex-protein-limited (Slp) due non H-2 genes. *Immunogenetics* **10**, 19.
240. Loreni, F.; Stavenhagen, J.; Kalff, M. and Robins, D. M.(1988) A complex androgen-responsive enhancer resides 2 kilobases upstream of the mouse SIp gene. *Mol. Cel. Biol.* **8**, 2350-2360.
241. Stavenhagen, J. & Robins, D. M.(1988) An ancient provirus has imposed androgen regulation on the adjacent mouse sex-limited protein gene. *Cell* **55**, 247-254.
242. Roos, M. H.; Shreffler, D. C. and Kornfeld, S.(1980) Role of glycosylation in the proteolytic processing and secretion of the 4th component of complement (Ss protein) of the mouse. *J. Immunol.* **125**, 1869-1871.
243. Ferreira, A.; Michaelson, J. and Nussenzweig, V.(1980) A polymorphism of the gamma-chain of mouse C4 controlled by the S region of the major histocompatibility complex. *J. Immunol.* **125**, 1178-1182.

-
244. Newell, S. L.; Shreffler, D. C. and Atkinson, J. P.(1982) Biosynthesis of C4 by mouse peritoneal macrophages. I. Characterization of an "in vitro" culture system and comparison of C4 synthesis by "low" vs "high" C4 strains. *J. Immunol.* **129**, 653-659.
245. Chaplin, D. D.; Woods, D. E.; Whitehead, A. S.; Golberger, G.; Colten, H. R. and Seidman, J. G.(1983) Molecular map of the murine S region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6947-6951.
246. Ogata, R. T.; Shreffler, D. C.; Sepich, D. S. and Lilly, S. P.(1983) cDNA clone spanning the alpha-gamma subunit junction in the precursor of the murine fourth complement component (C4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5061-5065.
247. Pattanakitsakul, S.; Zheng, J. H.; Natsuume-Sakai, S.; Takahashi, M. and Nonaka, M.(1992) Aberrant splicing caused by insertion of the B2 sequence into an intron of the complement C4 gene is the basis for low production in H-2k mice. *J. Biol. Chem.* **267**, 7814-7820.
248. Nakayama, K.; Pattanakitsakul, S.; Yokoyama, S.; Kimura, H.; Nonaka, M. and Takahashi, M.(1990) Post-transcriptional regulation of complement C4 in low C4-producing strain of mouse. *Immunogenetics* **31**, 361-367.
249. Dieli, F.; Sireci, G.; Lio, D. and Salerno A.(1989) *Eur. J. Immunol.* 1613.
250. Bruisten, S. & Demant, P.(1989) Regulation of expression of mouse C4 and Slp genes by non-H-2-linked genes. *Immunogenetics* **29**, 6-13.
251. Karp, D. R.; Parker, K. L.; Shreffler, D. C.; Slaughter, C. and Capra, J. D.(1982) Amino acid sequence homologies and glycosylation differences between the fourth component of murine complement and sex-limited protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6347-6349.
252. Atkinson, J. P.; McGinnis, K.; Brown, L.; Peterein, J. and Shreffler, D. C.(1980) A murine C4 molecule with reduced hemolytic efficiency. *J. exp. Med.* **151**, 492-497.
253. Karp, D. R.; Atkinson, J. P. and Shreffler, D. C.(1982) Genetic variation of glycosylation of the fourth component of murine complement. *J. Biol. Chem.* **257**, 7330-7335.
254. Tosi, M.; Lévi-Strauss, M.; Duponchel, C. and Meo, T.(1984) Sequence heterogeneity of murine cDNA clones related to the C4 and C4-Slp isoforms of the fourth complement component. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **306**, 389-394.
255. Karp, D. R.(1983) Variation in the glycosilation of the murine sex-limited-protein: comparison with the fourth component of murine complement. *J. Immunol.* **131**, 1405-1410.
256. Rosa, P. A.; Sepich, D. S.; Shreffler, D. C. and Ogata, R. T.(1985) Mice constitutive for sex-limited protein (Slp) expression contain multiple Slp gene sequences. *J. Immunol.* **135**, 627-631.
257. Pattanakitsakul, S.; Nakayama, K.; Takahashi, M. and Nonaka, M.(1990) Three extra copies of a C4-related gene in H-2(w7) mice are C4/Slp hybrid genes generated by multiple recombinational events. *Immunogenetics* **32**, 431-439.

-
258. Spinella, D. & Passmore, H. C.(1983) A newly defined murine alloantigen controlled by the S region of the H-2 complex: molecular association with the fourth component of complement. *J. Immunol.* **130**, 824-828.
259. Taillon-Miller, P. A. & Shreffler, D. C.(1988) Structural basis for the C4d1.C4d.2 serologic allotypes of murine complement component C4. *J. Immunol.* **141**, 2382-2387.
260. Bitter-Suermann, D.; Krönke, M.; Brade, V. and Hadding, U.(1977) Inherited polymorphism of guinea pig and C4: evidence for genetic linkage between the C4 and Bf loci. *J. Immunol.* **118**, 1822-1826.
261. Nonaka, M. & Takahashi, M.(1992) Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins. *J. Immunol.* **148**, 3290-3295.
262. Ishiguro, H.; Kobayashi, K.; Suzuki, M.; Titani, K.; Tomonaga, S.and Kurosawa, Y.(1991) Isolation a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J.* **11**, 829-837.
263. Fujii, T.; Sekizawa, A. and Katagiri, C.(1985) Characterization of the fourth component of complement in the serum of the clawed frog *Xenopus Laevis*. *Immunology* **56**, 743-750.
264. de Kroon, A. I. P. M.; Doxiadis, G.; Doxiadis, I. and Hensen, E. J.(1986) SUM tructure and polymorphism of the feline complement component C4. *Immunogenetics* **24**, 202-205.
265. Shevach, E. M.; Frank, M. M. and Green, I.(1976) Linkage of the gene controlling the synthesis of the fourth component of complement to the major histocompatibility complex of the guinea pig. *Immunogenetics* **3**, 595-560.
266. Spilliaert, R.; Palsdottir, A. and Arnason, A.(1990) Analysis of the C4 genes in baleen whales using a human cDNA probe. *Immunogenetics* **32**, 73-76.
267. Groth, D. M.; Wetherall, J. D.; TAYlor, L.; Sparrow, P. R. and Lee, I. R.(1988) Purification and characterisation of ovine C4: evidence for two molecular forms in ovine plasma. *Mol. Immunol.* **25**, 577-584.
268. Dodds, A. W.and Law, S. K.(1990) The complement component C4 of mammals. *Biochem. J.* **265**, 495-502.
269. Nonaka, M.; Takahashi, M.; Natsuume-Sakai, S.; Nonaka, Ma; Tanaka, S.; Shimizu, A. and Honjo, T.(1984) Isolation of cDNA clones specifying the fourth component of mouse complement and its isotype, sex-limited protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6822-6826.
270. Kawaguchi, H. & Klein, J.(1992) Organization of C4 and CYP21 loci in gorilla and orangutan. *Human Immunol.* **33**, 153-162.
271. Carroll, M. C.(1987) Molecular genetics of the fourth component of human complement. *FASEB* **46**, 2457-2462.

-
272. Prentice, H. L.; Schneider, P. M. and Strominger, J. L.(1986) C4B gene polymorphism detected in a human cosmid clone. *Immunogenetics* **23**, 274-276.
273. Hauptmann, G.; Tappeiner, G. and Schifferli, J. A.(1988) Inherited deficiency of the fourth component of human complement. *Immunodeficiency reviews* **1**, 3-22.
274. Kramer, J.; Fulop, T.; Rajczy, K.; Nguyen, A. T. and Fust, G.(1991) A marked drop in the incidence of the null allele of the B gene of the fourth component of complement (C4B*Q0) in elderly subjects: C4B*Q0 as a probable negative selection factor for survival. *Hum. Genet.* **86**, 595-598.
275. Carroll, M. C.; Palsdottir, A.; Belt, K. T. and Porter, R. R.(1985) Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO J.* **4**, 2547-2552.
276. Palsdottir, A.; Arnason, A.; Fossdal, R. and Jensson, O.(1987) Gene organization of haplotypes expressing two different C4A allotypes. *Hum. Genet.* **76**, 220-224.
277. Muir, W. A.; Hedrick, S.; Alper, C. A.; Ratnoff, O. D.; Schacter, B. and Wisniewski, J. J.(1984) Inherited incomplete deficiency of the fourth component of complement (C4) determined by a gene not linked to human histocompatibility leukocyte antigens. *J. Clin. Invest.* **74**, 1509-1514.
278. Nisonoff, A.; Hopper, J. E. and Spring, S. B.(1975) The antibody molecule. (Academic Press), ed) Dixon, F. J. Jr. & Kunkel, H. G., Nueva York, San Francisco, Londres.
279. Chan, P. C. Y & Cebra, J. J.(1968). *Immunochemistry* **5**, 1-8.
280. Goers, J. W. F. & Porter, R. R.(1978) The assembly of early components of complement on antibody-antigen aggregates and on antibody-coated erythrocytes. *Biochem. J.* **175**, 675-684.
281. Campbell, R. D.; Dodds, A. W. and Porter, R. R.(1980) The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. *Biochem. J.* **189**, 67-80.
282. Alcolea, J. M.; Antón, L. C.; Marqués, G.; Sánchez-Corral, P. and Vivanco, F.(1987) Formation of covalent complexes between the fourth component of human complement and IgG immune aggregates. *Complement* **4**, 21-32.
283. Garred, P.; Michaelsen, T. E.; Aase, A. and Molness, T. E.(1990) C3, C4 and the terminal complement complex differ from C1q by binding predominantly to the antigenic part of solid phase immune complexes. *J. Immunol.* **144**, 198-203.
284. Shohet, J. M.; Bergamaschini, L.; Davis, A. E. and Carroll, M. C.(1991) Localization of the human complement component C3 binding site on the IgG heavy chain. *J. Biol. Chem.* **266**, 18520-18524.
285. Shohet, J. M.; Pemberton, P. and Carroll, M. C.(1993) Identification of a major binding site for complement C3 on the IgG1 heavy chain. *J. Biol. Chem.* **268**, 5866-5871.
286. Antón, L. C., Alcolea, J. M.; Sánchez-Corral, P.; Marqués G. Sánchez, A and Vivanco, F.(1989) C3 binds covalently to the C γ 3 domain of IgG immune aggregates during complement activation by the alternative

- pathway. *Biochem. J.* **257**, 831-838.
287. Antón, L. C.; Ruiz, M. S.; Marqués, G.; Barrio, E.; Sánchez, A. and Vivanco, F. C3 binding to IgG hinge region (sometido a aceptación).
288. Lundwall, A.; Malmheden, I.; Stalenheim, G. and Sjöquist, J.(1981) Isolation of component C4 of human complement and its polypeptide chains. *Eur. J. Biochem.* **117**, 141-146.
289. Spinella, D. G.; Shah, D. D.; Hale, P. D. and Levine, R. P.(1984) Monoclonal antibodies to human C4. *Complement* **1**, 187-193.
290. Byrt & Ada (1980) Radio-iodination anti-ovalbumin IgG with ¹²⁵I it was done with cloramine T. *Immunology* **17**, 503-517.
291. Rapp, H. R. & Borsos, T.(1970) Molecular basis of complement action. (Appleton-Century-Crofts) ed) Meredith Corporation. Nueva York.
292. Ouchterlony, O.(1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. allergy.* **5**, 1-78.
293. Laemmli, U. K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
294. Law, S. K.; Lichtenberg, N. A.; Holcombe, F. H. and Levine, R. P.(1980) Interaction between the labile binding sites of the fourth (C4) and fifth (C5) human complement proteins and erythrocyte cell membranes. *J. Immunol.* **125**, 634-639.
295. Pro-Blott™ applications in SDS-PAGE, electroblotting and protein sequencing. *User Bulletin of Applied Biosystems* **42**, 1-12.
296. Alcolea, J. M. Localización del sitio de interacción de la inmunoglobulina G, con el cuarto componente del complemento humano. Estudios previos. *Universidad Complutense de Madrid*. Tesina.
297. Hsiung, L-M; Mason, D. W. and Dodds, A. W.(1987) A monoclonal antibody which can distinguish between the two isotypes of human C4. *Mol. Immunol.* **24**, 91-96.
298. Brown, E.; Ramsey, J.; Hammer, C. H. and Frank, M. M.(1983) Surface modulation of classical pathway activation: C2 and C3 convertase formation and regulation on sheep, guinea pig and human erythrocytes. *J. Immunol.* **131**, 403-408.
299. Bolotin, C.; Morris, S.; Tack, B. and Pahl, J.(1977) Purification and structural analysis of the fourth component of human complement. *Biochemistry* **16**, 2008-2015.
300. Ostberg, R.; Nilsson, U. R. and Eggersten, G.(1985) Dimerization of human complement C3 and C4 in dilute lauryl sulfate buffer after reaction with methylamine. *J. Biol. Chem.* **260**, 12970-12973.
301. Cooper, N. R. & Müller-Eberhard, H. J.(1968) A comparison of methods for the molecular quantitation of the fourth component of human complement. *Immunochemistry* **5**, 155-169.

-
302. Fleischmann, J. B.; Porter, R. R. and Press, E. M.(1963) The arrangement of the peptide chains in γ -globulin. *Biochem. J.* **88**, 220-228.
303. Circolo, A. & Borsos, T.(1982) C4 does not bind to human and rabbit IgM during activation of the classical complement pathway on the red cell. *J. Immunol.* **129**, 1485-1488.
304. Chou, P. Y. & Fasman, F. D.(1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzym.* **47**, 45-148.
305. Chakravarti, D. N.; Campbell, R. D. and Porter, R. R.(1987) The chemical structure of the C4d fragment of the human complement component C4. *Mol. Immunol.* **24**, 1187-1197.
306. Poljak, R. J.(1978) Studies on the three-dimensional structure of immunoglobulins en *Comprehensive Immunology*, vol. 5 (Plenum medical book company), ed) Litman, G. W. & Good, R. A. Nueva York y Londres.
307. Law, S. K. A. & Levine, R. P.(1977) Interactions between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 2701-2705.
308. Sim, R. B.; Twose, T. M.; Patterson, D. S. and Sim, E.(1981) The covalent binding reaction of complement component C3. *Biochem. J.* **193**, 115-127.
309. Sottrup-Jensen, L.; Stepanik, T. M.; Kristensen, T.; Lonblad, P. B.; Jones, C. M.; Wierzbicki, D. M.; Magnusson, S.; Domdey, S.; Wetsel, R. A.; Lundwall, A. and et al., (1985) Common evolutionary origin of alpha 2-macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 9-13.
310. Sottrup-Jensen, L.; Hansen, H. F.; Pedersen, H. S. and Kristensen, L.(1990) Localization of ϵ -lysyl- γ -glutamyl cross links in five human α 2-macroglobulin-proteinases complexes. *J. Biol. Chem.* **265**, 17727-17737.
311. Pangburn, M. K.(1989) Analysis of the mechanism of reconigition in the complement alternative pathway using C3b-bound low molecular weight polysaccharides. *J. Immunol.* **142**, 2759-2765.
312. Antón, L. C. (1992) Interacción entre el tercer componente (C3) del sistema del complemento humano e inmunocomplejos. *Universidad Complutense de Madrid*. Tesis Doctoral.